

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



X-53-371034-X

TESIS DOCTORAL

EVALUACIÓN BIOLÓGICA DEL SÍNDROME DE REVASCULARIZACIÓN EN UN
MODELO EXPERIMENTAL DE RECONSTRUCCIÓN VASCULAR DE EXTREMIDAD

Don JULIO MIGUEL VILA Y BLANCO



Director Profesor Doctor
Don Hipólito Durán Sacristán
Co-Director Doctor
Don José Antonio de Pedro Moro

MADRID, 1998

A mi mujer, **NURIA** ,
por su cariño y su paciencia,
por su apoyo constante y su
ayuda incondicional.

"Se debe operar solamente si se tiene alguna probabilidad de éxito; operar sin esta esperanza significa desvirtuar este magnífico arte y ciencia de la cirugía y hacerlo sospechoso ante los profanos y los colegas. Pero ¿cómo pueden medirse las probabilidades de éxito?. Con un estudio incansable de nuestra ciencia, con la crítica severa de nuestras observaciones y las ajenas, con la investigación más exacta en cada caso particular, y la evaluación crítica de nuestros experimentos."

(Theodor Billroth)

AGRADECIMIENTOS

- A Don **HIPÓLITO DURÁN SACRISTÁN**, Profesor Emérito de Patología Quirúrgica de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y Presidente de la Real Academia de Medicina Española, por su ejemplo, como persona y como profesor, y por su confianza en mi.
- A Don **JOSÉ ANTONIO DE PEDRO MORO**, Profesor Titular de Traumatología y Cirugía Ortopédica del Hospital Clínico de Salamanca, que me dedicó muchas horas de su tiempo, sin escatimar esfuerzos, y cuyas indicaciones han sido imprescindibles para la consecución de la Tesis Doctoral.
- A Don **PABLO ANTONIO GONZÁLEZ LÓPEZ**, Veterinario de la Unidad de Investigación Clínico-Experimental del Hospital Clínico San Carlos (Madrid), por su amabilidad y su cooperación en todo momento para proporcionar los medios y los animales necesarios para llevar a cabo la experimentación.
- A Don **JOSÉ MANUEL SANTOS GÓMEZ**, por su competencia profesional y humana, quien no ahorró esfuerzos a lo largo de esta Tesis para la realización de un impecable trabajo tipográfico.
- A Doña **M^a.TERESA MIRAS PORTUGAL**, Directora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria (Madrid), por su amabilidad y ayuda desinteresada en la realización de las técnicas de H.P.L.C.
- A Doña **MÓNICA SÖLLHUBER KRETZER**, Profesora Titular del Departamento de Química Orgánica y Farmacia de la Facultad de Farmacia (Madrid), cuya colaboración fué imprescindible para la realización de las técnicas de espectroscopia con R.N.M.
- A Don **EMILIO GÓMEZ DE LA CONCHA**, Jefe del Servicio de Inmunología del Hospital Clínico San Carlos (Madrid), por el apoyo prestado en la realización de las técnicas de laboratorio.
- A Don **SANTIAGO VALOR GARCÍA**, Coordinador del Área Asistencial de Laboratorio del Hospital de Alcorcón (Madrid), por ofrecerme desde el inicio del experimento su colaboración, necesaria para la consecución de un excelente trabajo de hematología.

- A Doña **SUSANA SERRANO BARRERO**, Profesora Titular de Escuela Universitaria del Departamento de Microbiología III de la Facultad de Ciencias Biológicas (Madrid), por su calidad humana, por su interés y su aportación en la consecución de un inmejorable trabajo iconográfico.
- A Don **ARMANDO MARTÍNEZ MARTÍNEZ**, Profesor Titular de Anatomía Patológica del Servicio de Anatomía Patológica I del Hospital Clínico San Carlos (Madrid), por sus consejos y su impecable trabajo en la ejecución de los estudios histoquímicos.
- A Doña **M^a. TERESA GONZÁLEZ MANTEIGA**, Profesora Titular de Matemática Aplicada del Departamento de Matemática Aplicada (Biomatemática) de la Facultad de Ciencias Biológicas (Madrid), por su amabilidad y gran profesionalidad en la realización del estudio estadístico.
- A Don **PEDRO PRATS LEÓN**, Licenciado en Ciencias Matemáticas de la Unidad de Investigación del Departamento de Medicina Preventiva del Hospital Clínico San Carlos (Madrid), por el apoyo prestado en la realización y transcripción del estudio estadístico.
- A Don **MANUEL RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ**, Catedrático de Mecánica de Fluidos de la E.S.I Aeronáuticos (Madrid), por su apoyo en la consecución bibliográfica y en la comprensión del flujo vascular.
- A Doña **AURORA FRAILE PÉREZ**, Profesora Titular de Patología Vegetal de la E.T.S.I Agrónomos (Madrid), por su colaboración en la obtención de la bibliografía necesaria sobre la anatomía de los animales de experimentación.
- A las siguientes personas:
 - *Laboratorio de Diabetes del Hospital Clínico San Carlos:
Don Francisco José MOYA MARÍN, Licenciado en Veterinaria.
 - *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria (Madrid):
Don Javier GUALIX SÁNCHEZ, Licenciado en Químicas.
Don Jesús PINTOR JUST, Doctor en Ciencias Biológicas.
 - *Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Clínico San Carlos:
Doña Nieves RECIO ROMERO, Técnico de Análisis Clínicos.
 - *Servicio de Inmunología del Hospital Clínico San Carlos:
Don Miguel FERNÁNDEZ ARQUERO, Biólogo Doctor en Inmunología.

*Servicio de Anatomía Patológica I del Hospital Clínico San Carlos:

Don Luis ORTEGA MEDINA, Facultativo Especialista de Área de Anatomía Patológica.

Doña Francisca PULIDO MICÓ, Técnico de Anatomía Patológica.

*Servicio de Anatomía Patológica II del Hospital Clínico San Carlos:

Doña Trinidad SANZ MARCO, Técnico de Anatomía Patológica.

*Unidad de Investigación Clínico-Experimental del Hospital Clínico San Carlos:

Don Antonio CARRASCO ÁLVAREZ, Cuidador de animales.

I.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. <u>HISTORIA</u>	2
A) POSIBILIDADES QUIRÚRGICAS DE LAS REIMPLANTACIONES	6
B) PROBLEMAS QUIRÚRGICOS DE LAS REIMPLANTACIONES	7
1.2. <u>ANATOMÍA DE LA EXTREMIDAD POSTERIOR DEL CONEJO</u>	13
1.3. <u>ANATOMÍA DE LA EXTREMIDAD INFERIOR HUMANA</u>	16
1.4. <u>BIOQUÍMICA: FOSFORILACIÓN OXIDATIVA</u>	21
1.5. <u>ETIOPATOGENIA</u>	26
A.- ISQUEMIA.....	27
a) <i>Cambios Morfológicos</i>	28
b) <i>Cambios Bioquímicos</i>	31
B.- REVASCULARIZACIÓN.....	34
1.6. <u>OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO</u>	36
A.- OBJETIVOS	36
B.- HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	36
II.- MATERIAL Y MÉTODO	37
2.1. <u>GENERALIDADES</u>	38
<u>ESQUEMA GENERAL DEL EXPERIMENTO</u>	42
2.2. <u>ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN</u>	50
2.3. <u>TÉCNICA QUIRÚRGICA</u>	51
A.- PROBLEMAS QUIRÚRGICOS BÁSICOS	51
B.- ANESTESIA	53
C.- INTERVENCIÓN	55
1.- <u>Preparación de la extremidad posterior</u>	55
2.- <u>Perfusión y Tiempo de Isquemia</u>	56
3.- <u>Revascularización de la extremidad</u>	56
2.4. <u>LABORATORIO</u>	58
A.- MEDIDA DE LOS NUCLEÓTIDOS DE ADENINA	58
B.- SEROLOGÍA	58
C.- MÚSCULO	59
2.5. <u>ESTUDIO HISTOLÓGICO</u>	61
A.- MÚSCULO	61
1.- <u>Histología</u>	61
2.- <u>Técnica histoquímica</u>	62
B.- NERVIO	66
2.6. <u>CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN</u>	68
A.- CONCEPTOS TEÓRICOS.....	68
B.- TÉCNICA EXPERIMENTAL.....	69
2.7. <u>ESPECTROSCOPIA CON RESONANCIA NUCLEAR MAGNÉTICA</u>	71
A.- APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA DEL P-31 CON R.N.M.	71
B.- TÉCNICA EXPERIMENTAL.....	73
2.8. <u>ESTUDIO DE LA CONDUCCIÓN NERVIOSA</u>	75
A.- CONCEPTOS TEÓRICOS.....	75

B.- TÉCNICA EXPERIMENTAL.....	77
2.9. <u>GRUPOS EXPERIMENTALES</u>	79
2.10. <u>ESTADÍSTICA</u>	80
III.- RESULTADOS	81
3.1. <u>RESULTADOS</u>	82
A.- ANIMALES UTILIZADOS.....	82
B.- DETERMINACIONES DE LABORATORIO	85
1.- <u>Hematología</u>	85
2.- <u>pH</u>	86
3.- <u>Serología</u>	95
C.- ESTUDIO HISTOLÓGICO	150
1.- <u>Estudio Macroscópico</u>	150
2.- <u>Microscopía Óptica</u>	150
3.- <u>Microscopía Electrónica</u>	151
D.- NUCLEÓTIDOS DE ADENINA: ESTUDIO CON CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA	174
E.- NUCLEÓTIDOS DE ADENINA: ESTUDIO CON RESONANCIA MAGNÉTICA.....	196
F.- RESPUESTA NEUROMUSCULAR.....	218
IV.- DISCUSIÓN	257
V.- CONCLUSIONES	280
VI.- BIBLIOGRAFÍA	283

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.- 1	44
Fig.- 2	44
Fig.- 3	45
Fig.- 4	45
Fig.- 5	46
Fig.- 6	46
Fig.- 7	47
Fig.- 8	47
Fig.- 9	48
Fig.- 10	48
Fig.- 11	49
Fig.- 12	52
Fig.- 13	52
Fig.- 14	89
Fig.- 15	89
Fig.- 16	89
Fig.- 17	90
Fig.- 18	90
Fig.- 19	91
Fig.- 20	91
Fig.- 21	92
Fig.- 22	92
Fig.- 23	93
Fig.- 24	93
Fig.- 25	103
Fig.- 26	103
Fig.- 27	103
Fig.- 28	105
Fig.- 29	105
Fig.- 30	105
Fig.- 31	107
Fig.- 32	107
Fig.- 33	107
Fig.- 34	108
Fig.- 35	108
Fig.- 36	109
Fig.- 37	109
Fig.- 38	110
Fig.- 39	110
Fig.- 40	111
Fig.- 41	111
Fig.- 42	113
Fig.- 43	113
Fig.- 44	114
Fig.- 45	114
Fig.- 46	115
Fig.- 47	115
Fig.- 48	116
Fig.- 49	116
Fig.- 50	118
Fig.- 51	118
Fig.- 52	119
Fig.- 53	119

Fig.- 54.....	120
Fig.- 55.....	120
Fig.- 56.....	121
Fig.- 57.....	121
Fig.- 58.....	123
Fig.- 59.....	123
Fig.- 60.....	124
Fig.- 61.....	124
Fig.- 62.....	125
Fig.- 63.....	125
Fig.- 64.....	126
Fig.- 65.....	126
Fig.- 66.....	135
Fig.- 67.....	135
Fig.- 68.....	136
Fig.- 69.....	136
Fig.- 70.....	137
Fig.- 71.....	137
Fig.- 72.....	138
Fig.- 73.....	138
Fig.- 74.....	140
Fig.- 75.....	140
Fig.- 76.....	141
Fig.- 77.....	141
Fig.- 78.....	142
Fig.- 79.....	142
Fig.- 80.....	143
Fig.- 81.....	143
Fig.- 82.....	154
Fig.- 83.....	145
Fig.- 84.....	146
Fig.- 85.....	146
Fig.- 86.....	147
Fig.- 87.....	147
Fig.- 88.....	148
Fig.- 89.....	148
Fig.- 90.....	154
Fig.- 91.....	154
Fig.- 92.....	155
Fig.- 93.....	155
Fig.- 94.....	156
Fig.- 95.....	156
Fig.- 97.....	157
Fig.- 98.....	157
Fig.- 99.....	158
Fig.- 100.....	158
Fig.- 101.....	159
Fig.- 102.....	159
Fig.- 103.....	160
Fig.- 104.....	161
Fig.- 105.....	161
Fig.- 106.....	162
Fig.- 107.....	162
Fig.- 108.....	163
Fig.- 109.....	163

Fig.- 110.....	164
Fig.- 111.....	164
Fig.- 112.....	165
Fig.- 113.....	165
Fig.- 114.....	166
Fig.- 115.....	167
Fig.- 116.....	167
Fig.- 117.....	167
Fig.- 118.....	168
Fig.- 119.....	168
Fig.- 120.....	169
Fig.- 121.....	169
Fig.- 122.....	170
Fig.- 123.....	170
Fig.- 124.....	171
Fig.- 125.....	171
Fig.- 126.....	172
Fig.- 127.....	172
Fig.- 128.....	173
Fig.- 129.....	179
Fig.- 130.....	179
Fig.- 131.....	179
Fig.- 132.....	179
Fig.- 133.....	181
Fig.- 134.....	181
Fig.- 135.....	181
Fig.- 136.....	183
Fig.- 137.....	183
Fig.- 138.....	183
Fig.- 139.....	184
Fig.- 140.....	184
Fig.- 141.....	185
Fig.- 142.....	185
Fig.- 143.....	188
Fig.- 144.....	188
Fig.- 145.....	189
Fig.- 146.....	189
Fig.- 147.....	192
Fig.- 148.....	192
Fig.- 149.....	193
Fig.- 150.....	193
Fig.- 151.....	198
Fig.- 152.....	199
Fig.- 153.....	200
Fig.- 154.....	201
Fig.- 155.....	202
Fig.- 156.....	203
Fig.- 157.....	204
Fig.- 158.....	205
Fig.- 159.....	206
Fig.- 160.....	207
Fig.- 161.....	208
Fig.- 162.....	209
Fig.- 163.....	210
Fig.- 164.....	211

Fig.- 165.....	212
Fig.- 166.....	213
Fig.- 167.....	214
Fig.- 168.....	215
Fig.- 169.....	216
Fig.- 170.....	217
Fig.- 171.....	227
Fig.- 172.....	227
Fig.- 173.....	227
Fig.- 174.....	229
Fig.- 175.....	229
Fig.- 176.....	229
Fig.- 177.....	231
Fig.- 178.....	231
Fig.- 179.....	231
Fig.- 180.....	232
Fig.- 181.....	232
Fig.- 182.....	233
Fig.- 183.....	233
Fig.- 184.....	234
Fig.- 185.....	234
Fig.- 186.....	235
Fig.- 187.....	235
Fig.- 188.....	237
Fig.- 189.....	237
Fig.- 190.....	238
Fig.- 191.....	238
Fig.- 192.....	239
Fig.- 193.....	239
Fig.- 194.....	240
Fig.- 195.....	240
Fig.- 196.....	242
Fig.- 197.....	242
Fig.- 198.....	243
Fig.- 199.....	243
Fig.- 200.....	244
Fig.- 201.....	244
Fig.- 202.....	245
Fig.- 203.....	245
Fig.- 204.....	247
Fig.- 205.....	247
Fig.- 206.....	248
Fig.- 207.....	248
Fig.- 208.....	249
Fig.- 209.....	249
Fig.- 210.....	250
Fig.- 211.....	250
Fig.- 212.....	252
Fig.- 213.....	252
Fig.- 214.....	253
Fig.- 215.....	253
Fig.- 216.....	254
Fig.- 217.....	254
Fig.- 218.....	255
Fig.- 219.....	255

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	I	84
TABLA	II	88
TABLA	III	94
TABLA	IV	94
TABLA	V	102
TABLA	VI	104
TABLA	VII	106
TABLA	VIII	112
TABLA	IX	112
TABLA	X	117
TABLA	XI	117
TABLA	XII	122
TABLA	XIII	122
TABLA	XIV	127
TABLA	XV	127
TABLA	XVI	139
TABLA	XVII	139
TABLA	XVIII	144
TABLA	XIX	144
TABLA	XX	149
TABLA	XXI	149
TABLA	XXII	178
TABLA	XXIII	180
TABLA	XXIV	182
TABLA	XXV	186
TABLA	XXVI	186
TABLA	XXVII	187
TABLA	XXVIII	190
TABLA	XXIX	190
TABLA	XXX	191
TABLA	XXXI	194
TABLA	XXXII	194
TABLA	XXXIII	195
TABLA	XXXIV	226
TABLA	XXXV	228
TABLA	XXXVI	230
TABLA	XXXVII	236
TABLA	XXXVIII	236
TABLA	XII	241
TABLA	XL	241
TABLA	XLI	246
TABLA	XLII	246
TABLA	XLIII	251
TABLA	XLIV	251
TABLA	XLV	256
TABLA	XLVI	256

ABREVIATURAS

Ácido dexoxirribonucleico	ADN
Ácido perclórico	PCA
Adenosín monofosfato	AMP
Adenosín difosfato	ADP
Adenosín trifosfatasa	ATP-asa
Adenosín trifosfato	ATP
Agua	H ₂ O
Anhidrido Carbónico	CO ₂
Calcio	Ca ²⁺
Centímetro/s	cm
Centímetro/s cúbico/s	cc o cm ³
Creatín fosfo-kinasa	CPK
Cromatografía líquida de alta presión	HPLC
Dinucleótido de adenina nicotinamida	DAN
Edición	Edic
Editorial	Edit
Espectro (Free induction decay)	FID
Figura	Fig
Fosfato de creatina	PCr
Fosfato inorgánico	Pi
Fosfo diéster	PDE
Fosfo monoéster	PME
Grado/s centígrado/s	°C
Hora/s	h
Intramuscular	im
Intravenosa	iv
Kilogramo/s	kg
Láctico deshidrogenasa	LDH
Miliamperio/s	mA
Miliequivalentes/Litro	mEq/L
Miligramo/s	mgr
Miligramos/decilitro	mgr%
Mililitro/s	ml
Mililitro/s hora/s	ml/h
Milímetro/s	mm
Milímetros de mercurio	mmHg
Milimoles/Litro	mmol/L
Minuto/s	min
Nicotinamida desidrogenasa	NADH
Oxígeno	O ₂
Página/s	pág
Partículas por millón	ppm
Picomoles	pm
Porcentaje	%
Potasa	KOH
Potasio	K ⁺
Protón	H ⁺
Resonancia nuclear magnética	RNM o RMN
Segundo/s	s
Succinil deshidrogenasa	SDH
Transaminasa glutámico oxalacético	GOT
Unidades internacionales/Litro	UI/L

I.- INTRODUCCIÓN

1.1. HISTORIA

El abordaje experimental de los problemas biológicos fue establecido en el siglo XIX por diversos investigadores, entre ellos Theodor Billroth (16). Y dentro del amplio campo de la Cirugía Experimental, el reimplante de miembros ha sido una de sus metas, considerada como de difícil logro ya que está relacionado con el problema de la isquemia (5,54,174).

Cuando ocurre la amputación traumática de un miembro tenemos, en teoría, tres alternativas para su tratamiento:

A.- Reimplantar la parte amputada de inmediato.

B.- Trasplantar el miembro.

C.- Colocar una prótesis.

Todas estas soluciones tienen sus pros y sus contras. En general, los trasplantes del sistema músculo-esquelético están limitados. Los homotrasplantes de miembros, que evitan la utilización de terapia inmunosupresora, han recibido escasa atención, comparado con otros tejidos y órganos. La realización de trasplantes de aloinjertos tisulares compuestos periféricos, de piel, músculo, hueso, vasos y nervios no son satisfactorios ya que precisan de terapia inmunosupresora. El agente más utilizado es la Ciclosporina-A, agente inmunosupresor no específico. La presencia de antígenos en las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos del injerto donante son la causa del rechazo (7). Tenemos, por lo tanto, que decidir entre la reimplantación, en uno o dos tiempos (187), y la prótesis. Las prótesis han alcanzado perfeccionamientos muy notables en estos últimos años, pero son todavía imperfectas y tienen grandes desventajas, como el alto coste, rehabilitación complicada, falta de sensación, etc.

En las últimas décadas se han realizado, de forma clínica y experimental, múltiples ensayos para poner a punto técnicas que permitieran llevar a cabo los reimplantes con efectividad.

En el estado actual de la investigación científica ninguna rama puede permanecer aislada. Los problemas de reimplantación y trasplante de miembros, basados de manera fundamental en técnicas traumatológicas y microquirúrgicas, necesitan: de la anatomía, para asegurarse que las suturas se realizan de forma y en lugar correcto; de la histología, para lograr un mejor conocimiento de las

lesiones de los tejidos, su cicatrización y regeneración; de la reología hemática (208), para comprender el flujo sanguíneo y la capacidad de los eritrocitos para deformarse al atravesar el territorio capilar; de la fisiología, para solucionar los problemas bioquímicos y la coagulación intravascular; de la inmunología, para abordar el estudio de los problemas del rechazo; de la física, para ayudarnos en los estudios de la recuperación de los nervios, de los músculos y los flujos sanguíneos; de la clínica, para realizar una rehabilitación adecuada y un seguimiento de la recuperación funcional del miembro reimplantado.

Considero que la única actitud científica válida para solucionar todos estos problemas es el trabajo previo del laboratorio y, en el caso específico de los problemas quirúrgicos, es necesario utilizar la experimentación animal en un centro quirúrgico experimental.

El ser humano utiliza el mundo animal para su progreso científico, con el fin primordial de la supervivencia; esto hace que se haga imprescindible la experimentación animal por:

- 1.- No poder aplicar directamente en el hombre muchos descubrimientos científicos sin una previa comprobación en un ser vivo.
- 2.- Ser necesaria una constatación en cuanto a cantidad y calidad de los nuevos descubrimientos, y ser necesaria su comprobación en un número adecuado de elementos vivos más o menos comparables con el ser humano.
- 3.- Es impensable una experimentación humana, en los primeros niveles, con voluntarios, aunque se realice en los últimos y una vez comprobados todos los riesgos en el animal de experimentación (222).

Los avances en el campo de la microcirugía vascular, la mejora de los medios de magnificación, de los materiales de sutura, del instrumental y de los medios de control y seguimiento, llevados a cabo en los últimos años, serán la solución definitiva para los reimplantes.

Por ello, he desarrollado en los últimos 3 años un trabajo experimental en conejos, que ha conestado de las siguientes fases:

- 1) Estudio anatómico de la extremidad inferior.
- 2) Estudio de la revascularización de la extremidad mediante técnicas de microcirugía.
- 3) Estudio de los patrones clínico-morfológicos, histológicos y de laboratorio de la interrupción vásculo-nerviosa de la extremidad posterior.

Höpfner (95), en 1903, fué el primero que publicó la unión experimental con éxito de una extremidad trasera amputada a un perro, que vivió once días, necesitando ser sacrificado por un fracaso circulatorio. Carrel y Guthrie (28), en 1906, publicaron la reimplantación con éxito de dos miembros de perro recién amputados, pero ambos animales murieron, uno a las 50 horas y otro a los 10 días. Jeger (106), en 1914, efectuó el primer reimplante con éxito de un brazo que se seccionó, quedando unido por la piel a modo de puente. Y no hubo más notificaciones.

En 1960, Lapchinsky (121) (URSS), enfriando la extremidad a 4°C, y Snyder (201) (EEUU), utilizando la oxigenación hiperbárica, publicaron resultados con éxitos similares en los reimplantes de extremidades en perros (alto porcentaje de fracasos). En 1963, Onji (154) publicó su obra experimental sobre reimplantes. En 1964, Eiken (57,58) presentó la patofisiología, la técnica y los resultados de sus experimentos de larga duración en la reimplantación de extremidades de perros.

El primer reimplante humano con éxito notificado en los países anglófonos fué en 1964, Malt y McKhann (133), efectuado en 1962 en el brazo de un niño de 12 años. Y en los países germánicos, Lindner y Vollmar (128) notificaron en 1965 siete macro-reimplantaciones efectuadas en la clínica de Heidelberg entre los años 1953 y 1964.

A partir de entonces, aparecen múltiples informes de reimplantes de casos individuales. El país que con más entusiasmo desarrolló los reimplantes, a partir de los años 60, fué China. En 1963, Ch'en (41) presentó en el XX Congreso de la Sociedad Internacional de Cirugía en Roma el caso, seguido de éxito, del reimplante de una mano amputada. En 1978, el Sexto Hospital Municipal de Shangai (191) notificó que habían reimplantado con éxito 10 extremidades completas amputadas y habían reconstruido otras 14, que sólo estaban unidas por un pequeño puente de tejidos blandos que no contenían ninguno de los vasos ni los nervios principales. Otros investigadores que han informado de éxitos son Seo (189) en 1987, Costecalde (36) en 1989, etc.

En nuestros días se han realizado, de forma clínica y experimental, diversos estudios que permiten llevar a cabo este tipo de operaciones. Se han ensayado las técnicas quirúrgicas más idóneas (5,22,78); se mantienen los tejidos en soluciones frías, para una mejor conservación de las extremidades amputadas y una mayor posibilidad de supervivencia (111,198,211,220); se realizan mediciones de la tensión de

oxígeno transcutánea (70,136,169,234); se vigila el estado nutricional de los pacientes (17,52,108); se intenta evitar el síndrome compartimental (89,135,170); se conoce mejor la anatomía vascular que irriga a los huesos largos y a la musculatura de las extremidades (72,98,217); se evalúa el drenaje linfático (33,38,56,199); se mide la función de los nervios (42,48,84,114); se controla el tiempo de la isquemia quirúrgica (112,167,189); se investiga la tolerancia del músculo a la isquemia (55,92,163,197); etc.

La reproducción experimental de síndromes de revascularización, mediante diferentes métodos, ha sido realizada en múltiples ocasiones con la finalidad de superponer los hallazgos clínicos en el hombre a los de los animales de experimentación. El fin último de los citados procedimientos es doble: 1) el estudio de los patrones patobiológicos; y 2) el tratamiento de estas lesiones, para ser aplicados al ser humano con posterioridad.

Con este propósito, se han utilizado numerosos animales de experimentación (ratas, conejos, gatos, perros, cerdos) y diferentes mecanismos (quirúrgicos y no quirúrgicos) para la producción y el estudio de los diferentes procesos que intervienen en la revascularización de extremidades.

A.- Procedimientos no quirúrgicos

- Manguitos de esfingomanómetros y lazos (137,160,171).
- Plasma autólogo y sangre heparinizada autóloga intracompartimental (85,89).
- Microesferas y Microémbolos de carbón (72,209).

En todos ellos se produce isquemia o un síndrome compartimental.

B.- Procedimientos quirúrgicos

La mayoría de las técnicas experimentales de producción de un traumatismo, con su posterior revascularización y reimplantación, han sido desarrolladas siguiendo pautas quirúrgicas y han demostrado ser eficaces en la consecución de dicho objetivo.

- Amputación total de la extremidad (199,207,219) o amputación conservando el nervio ciático (212).
- Amputación parcial de la extremidad trasera, con conservación de estructuras vasculo-nerviosas (185) y musculares (68,176,178).
- Trasplantes ortotópico y singénico de injertos de músculo (92,213,232).
- Heridas por avulsión en humanos (93) y reimplantes de extremidades en humanos tras sufrir

amputación (169,199,234).

Dichas técnicas y experimentos han abierto nuevos caminos a la investigación, ya que han aparecido hechos clínicos que han servido para ampliar los conocimientos de la fisiopatología del miembro amputado, posibilitando que el reimplante de miembros en el ser humano sea ya una operación establecida (5,54).

En la actualidad, aunque es posible llevar a cabo este tipo de operaciones, existen una cantidad considerable de problemas aún no resueltos, que hacen fracasar muchos de los intentos quirúrgicos, aunque éstos sean efectuados de manera correcta desde el punto de vista técnico.

A) Posibilidades quirúrgicas de las reimplantaciones

Las circunstancias en las que puede valorarse la realización de una reimplantación se encuentran dentro de uno de los siguientes apartados:

1.- Amputaciones con superficie de sección limpia y estructuras anatómicas seccionadas en un mismo plano. Cuanto más limpia sea la superficie de sección más fácil resulta, desde el punto de vista técnico, la reimplantación (7,188), y los trastornos fisiopatológicos que aparecen en el postoperatorio serán de menor cuantía, por lo que se puede decir que reúnen las características idóneas para efectuar la operación (5,54).

2.- Amputaciones traumáticas con muñones contundidos. Es el caso más frecuente de las amputaciones traumáticas. La existencia de zonas contundidas, sobre todo si éstas radican en tejidos musculares, favorece la infección de la herida y el posterior fracaso de la reimplantación, máxime cuando en los primeros días no existe circulación linfática, por su no anastomosis (5). Para llevar a cabo la reimplantación es necesario realizar una extirpación de todas las zonas contusas y practicar suturas sobre tejidos sanos, lo cual, conlleva un acortamiento de la extremidad de varios centímetros. Los resultados son menos esperanzadores, aunque se debe intentar la reimplantación (7,54,188).

3.- Arrancamiento de las extremidades o desmembraciones. Caracterizadas porque cada una de las diferentes estructuras que forman la extremidad están seccionadas a un nivel diferente. Aparece en los accidentes industriales en los que una correa de transmisión aprisiona una extremidad y la separa del cuerpo. En estas ocasiones concurren dos hechos anatomopatológicos:

1º) la extremidad amputada sufre importantes lesiones como consecuencia del fuerte apesamiento a que se ha visto sometida; y 2º) la separación de los tejidos tiene lugar a niveles muy distintos: el hueso y los vasos se seccionan a diferentes alturas, los músculos pueden aparecer arrancados y los nervios, por ser estructuras que resisten bien la elongación, pueden verse seccionados a nivel raquídeo. La reimplantación requerirá la extirpación de todos los tejidos desvitalizados y contundidos, y la reparación de las distintas estructuras será mucho más difícil en el aspecto técnico, necesitando amplias disecciones anatómicas que precisan diferentes abordajes.

Hoy, las posibilidades quirúrgicas de obtener éxito son muy escasas y, aún conservando la viabilidad de la extremidad, la calidad funcional de la misma será muy problemática, por lo cual, se desaconseja su realización (5,54).

4.- Tratamiento de tumores.

5.- Autorreimplantaciones. Consisten en la reimplantación en el mismo individuo de extremidades o parte de extremidades a otra zona de su cuerpo (5,187). El caso más divulgado en la clínica actual es la transposición de los dedos del pie a la mano (7,54).

B) Problemas quirúrgicos de las reimplantaciones

Antes de analizar los problemas quirúrgicos que conllevan este tipo de operaciones debemos diferenciar de manera clara los tipos de reimplantación que pueden efectuarse: **reimplantaciones menores** (incluyen las de los dedos y la mitad de la mano), cuyas dificultades técnicas se solucionan por la microcirugía y no producen repercusiones fisiopatológicas generales (5,7,54); **reimplantaciones mayores o totales** (reimplantación de extremidades, totales o parciales), las cuales originan serias alteraciones fisiopatológicas, tanto más intensas cuanto mayor es la extremidad a reimplantar, debido, entre otras razones, a la masa muscular y a la cantidad de tejido corporal que se ha visto privado de circulación (sometido a isquemia durante un cierto tiempo) (7,54,188). En estas últimas hemos de considerar que su realización entraña los siguientes tipos de problemas:

1.- Técnicos. La desconexión completa de un miembro y su posterior conexión requiere la aplicación de una técnica adecuada para la disección de todas las estructuras de la extremidad (7,54,188). Esta disección deberá ser efectuada produciendo el mínimo trauma posible. De todas las estructuras, la

vascular requerirá una perfecta identificación y una cuidadosa exposición. La arteria principal del miembro debe ser respetada con todas sus colaterales, para facilitar la irrigación de la extremidad en el postoperatorio (5,103), y su adventicia debe ser disecada y extirpada para facilitar su sutura. Con las venas principales se sigue la misma técnica, teniendo presente que la fragilidad de sus paredes hace que las lesiones sean más difíciles de reparar que en las arterias. Las anastomosis, tanto arteriales como venosas, deberán ser perfectas (5,54,188). Debe tenerse presente siempre que la viabilidad inmediata de la extremidad depende de la correcta práctica de las suturas vasculares, y que mientras los defectos técnicos en otras estructuras pueden corregirse con posterioridad, en estas anastomosis deben ser corregidos de inmediato (5,54).

El hecho de la existencia de pulso en regiones distales a la anastomosis arterial no es índice de la correcta sutura de la misma, ya que éste se conserva aunque exista cierto grado de estenosis, la cual, puede ser origen de posteriores trombosis que harán fracasar la reimplantación. En otras ocasiones, la estenosis puede producir una disminución del flujo que va a favorecer el desencadenamiento de fenómenos fisiopatológicos, como la presencia de infección, entre otros (5,54).

Las anastomosis venosas deben ser realizadas, también, a plena satisfacción, para permitir un correcto drenaje venoso en una extremidad que de manera inevitable va a verse edematizada. Por otro lado, es conocida la facilidad con que se producen trombosis en las suturas venosas debido a la menor velocidad circulatoria (5,54).

La trombosis, ya sea arterial o venosa, es la complicación más temida que puede presentarse en el reimplante, conduciendo al fracaso del mismo. El trombo se forma en la línea de sutura por cambios electrostáticos en la superficie de la íntima (inversión por lesión debida al traumatismo y manipulación quirúrgica); o distales, por un flujo enlentecido o turbulento que provoca aumento de la viscosidad de la sangre y formación de placas de ateroma. Las trombosis arteriales pueden ser: **a)** inmediatas o precoces, en las primeras horas del postoperatorio y requieren reintervención rápida de las anastomosis bajo nueva hibernación, y **b)** tardías, en cuyo caso la supervivencia del segmento reimplantado depende de su dimensión y de la circulación colateral ya establecida en el momento de la interrupción de la vía principal (145).

Las trombosis venosas, al contrario que las arteriales, pueden ser a menudo dominadas por

métodos rudimentarios con ingenio y paciencia. Cuando la congestión que produce es moderada, las incisiones paraungueales tipo Lendway o pulpaes permiten un sangrado de descarga mantenido por la heparinización sistémica (145).

Aunque la valoración clínica y la pericia quirúrgica valoran los patrones para el éxito de la reimplantación, el fracaso o la curación es, a menudo, multifactorial. El éxito no solo está subordinado a factores intraoperatorios (de la técnica quirúrgica), sino también a factores postquirúrgicos (infección, hematoma, edema y trombosis intravascular, sobre todo venosa) (145,169).

El desarrollo de técnicas no invasivas para el diagnóstico de la enfermedad vascular periférica ha conducido a su aplicación en la predicción de la curación de los reimplantes. La medición del flujo sanguíneo de la piel usando Xenon-133 (146) y Termografía (204), la temperatura cutánea (124), la medición de la presión sanguínea mediante ultrasonido Doppler y un esfigmomanómetro (70,87,169), la vascularización tisular mediante fluoresceína (69,196) y pletismografía (200) son diferentes métodos disponibles, pero aún no son seguros, para fijar los niveles críticos de circulación (23,166), siendo más precisa la determinación de la saturación de oxígeno transcutánea postoperatoria mediante pulsioxímetros (70,82,169).

La osteosíntesis tiene que ser sólida, lo suficiente como para impedir cualquier movilidad anormal en una extremidad que, por sufrir un gran edema en los primeros días del postoperatorio, va a ser imposible realizar una correcta inmovilización con vendajes enyesados, e incluso, precisará de una fasciotomía (60,193).

Las suturas nerviosas deben practicarse en todos los nervios principales de la extremidad (61,131) ayudándose del microscopio quirúrgico, aunque en ocasiones su uso no es imprescindible (5).

La sutura de los diferentes paquetes musculares y tendones se efectuará (7,54,188) de tal manera que se eviten las adherencias que disminuyan la funcionalidad de una extremidad, que con anterioridad ha sido denervada en su totalidad (5).

Por otro lado, si la amputación se realiza en extremidades con grandes masas musculares, es fácil comprender que existe un territorio abonado para la aparición de infecciones en el postoperatorio, y la lucha contra las mismas se verá dificultada por carecer de un sistema defensivo tan importante como es la circulación linfática, por no repararse las vías linfáticas en este tipo de operaciones (5,199).

El cierre de la piel será lo más laxo posible, para permitir la salida de exudados a través de la herida (5,188).

Todo ello hace que la reimplantación de un miembro sea una operación de una técnica laboriosa, que requiere el tratamiento de diferentes estructuras, todas ellas con una importancia primordial a la hora de valorar la funcionalidad y el resultado conseguido (5,54).

2.- Isquémicos. La amputación de una extremidad y su desconexión corporal supone la interrupción de la circulación y, por tanto, el mantenimiento de la misma en isquemia total durante un cierto tiempo (9,63,107). Es sabido los diferentes grados de resistencia a la isquemia que presentan los tejidos; así, a las cuatro horas de la desconexión circulatoria aparecen lesiones degenerativas en los nervios y en el tejido muscular (5,119,123). En el tejido nervioso la regeneración no es posible si ha sido afectada la neurona (21,130), mientras que en las fibras musculares la recuperación es tanto más problemática cuanto mayor es el tiempo de isquemia (172,179,206).

La piel y los vasos pueden resistir durante veinticuatro horas. Pero aunque las células no mueran en el período de isquemia su función cesa, siendo expresión clínica de la misma la frialdad que aparece a los pocos minutos de amputar la extremidad (5,54).

Para retrasar en lo posible la aparición de estos fenómenos se ha recurrido al enfriamiento de las extremidades (3,47,149,182). Todos los métodos corrientes de enfriamiento intenso de segmentos de extremidades incluyen una recomendación empírica de hielo, de baño helado o de perfusión arterial con un líquido a baja temperatura (79,109,221), que enfrien toda la extremidad. Envolviendo la pieza en gasas humedecidas y en bolsas de plástico y, entonces, colocándola de manera directa sobre el hielo podemos reducir la temperatura en el tejido a 1°C o menos, pero se daña la pieza por congelación. Por ello, se recomiendan métodos alternativos, como son la inmersión de la pieza en una bolsa de plástico con una solución Ringer lactato o una solución salina fisiológica en su interior y colocarla después sobre el hielo (218); o envolver el segmento en gasas húmedas y en una bolsa de plástico y sumergirlo, luego, en un baño helado (59,167,221). La inmersión en un baño helado reducirá la temperatura de los tejidos sumergidos ligeramente por encima de los 0°C (155). Esto ha hecho que en el lenguaje quirúrgico se introduzca el término de "**isquemia caliente**", con el cual nos referimos al tiempo que ha permanecido desconectada de los vasos sanguíneos a temperatura ambiente y sin la

aplicación de procedimientos de enfriamiento (68). Por "**isquemia fría**" entendemos el tiempo que ha permanecido la extremidad sometida a los procedimientos de enfriamiento (5).

3.- Desclampage. En las reimplantaciones de extremidades totales o casi totales, al finalizar la reconstrucción vascular y restablecer la circulación, tras la retirada de los clanes, aparece un cuadro consistente en caída de la tensión arterial y taquicardia, que puede poner en peligro la vida del enfermo. Dicho cuadro se denominó shock del desclampage y ocurre cuando se mantiene privado de circulación un territorio muscular y se procede a su brusca revascularización (expresión clínica similar sería el síndrome de aplastamiento o insuficiencia renal postraumática y el síndrome de revascularización de Haimovici) (5,54,100,153). Su presencia se cree que es debida a dos factores. Por un lado, el brusco paso al torrente circulatorio de catabolitos y sustancias ácidas originadas en la extremidad durante el período de isquemia (154,156,167), ya que desde los trabajos de Allen (3,4) se conoce la posibilidad de producir un síndrome tóxico en los animales de experimentación tras la inyección de extractos musculares. En segundo lugar, se ha invocado el hecho de la gran plasmorragia que sufren estas extremidades al restablecer de manera brusca la circulación en un lecho vascular que se encuentra atónico, dilatado y con unos capilares que, debido a la anoxia, mantienen un aumento de la permeabilidad (138,142,190). Todo ello producirá una gran salida de líquido de la luz vascular al intersticio, contribuyendo a desencadenar un edema y un estado de shock. Su instauración suele hacerse manifiesta a los pocos minutos de haber restablecido la circulación y su clínica será tanto más intensa cuanto mayor cantidad de tejido muscular sufra isquemia (5,54).

Una de las técnicas utilizadas para evitarlo es el control de la velocidad y la cantidad de suero perfundidos (14,100,143,153).

4.- Edema. Es otro hecho que aparece siempre tras las reimplantaciones. Desde el punto de vista clínico es un edema blando, que deja fôvea y se instaura en el primer día del postoperatorio. Sus posibles causas son dificultades en el drenaje venoso de la extremidad, por defectos técnicos al realizar las anastomosis venosas, y alteraciones del drenaje linfático. Por otro lado, tras la correcta revascularización, en extremidades que han sufrido isquemia aparece con frecuencia edema, como se observa en el síndrome de revascularización tras la cirugía arterial directa de las extremidades.

Mediante la perfusión de soluciones de manera controlada (14,15), la hipotermia (233) o la

utilización de oxígeno hiperbárico (151), se reduce la intensidad del edema.

5.- Denervación. Tras la amputación se produce una denervación completa de la extremidad, al interrumpirse todas las fibras nerviosas que llegan a la misma, tanto del sistema de la vida de relación como del sistema vegetativo (152,216,230). La sutura de los nervios de la extremidad no va a impedir que por espacio de semanas el miembro se encuentre sin estímulos nerviosos y va a hacer que no exista sensibilidad en la extremidad reimplantada (115), cuando podría ser de suma ayuda para detectar alteraciones, como infecciones, isquemia, etc. La supresión del dolor como mecanismo de defensa ante estas situaciones anormales hace que la exploración de la extremidad deba ser muy cuidadosa, a fin de despistar esta situación (5).

La ausencia de inervación motora va a convertir la extremidad en un miembro paralítico y atónico. La supresión de los axones de las neuronas procedentes del asta anterior medular hace que se pierda el llamado "control idiodinámico", o pérdida de la acción trófica ejercida por las motoneuronas periféricas sobre las fibras musculares esqueléticas (144). Este hecho y la interrupción del sistema nervioso vegetativo favorece la anhidrosis y la rápida atrofia de piel, músculo y huesos en unos miembros que por la inmovilización a que van a ser sometidos están predispuestos a padecerlas (5,54).

1.2. ANATOMÍA DE LA EXTREMIDAD POSTERIOR DEL CONEJO

La experimentación animal es un tipo de investigación que conlleva la utilización en la misma de seres vivos, algunos de ellos con un gran porcentaje de participación en las actividades que el ser humano desarrolla desde el punto de vista social.

Es por ello, la utilización de seres vivos, y no por motivos de aprecio discriminado, lo que nos debe llevar a una utilización racional, coherente y ordenada de los mismos; evitando abusos y otorgándoles el adecuado trato. Utilización que viene regulada por el Real Decreto 223/1988, de 14 de Marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (223).

Por otro lado, la investigación en general debe ser rigurosa y fiable, desarrollando una metodología científica, lo que condiciona que del mismo modo que se selecciona el más preciso de los aparatos de medida o el más sensible de los reactivos químicos para análisis, se haga lo propio con el más adecuado y seleccionado animal de experimentación, que conllevará que los animales estén muy bien cuidados, sanos, bien alimentados, alojados en el hábitat adecuado y con las condiciones ambientales propias de cada especie. Los animales que no reúnan estos requisitos es preferible no utilizarlos en investigación, dado que la respuesta aportada tiene todas las probabilidades de no ser correcta. Las especies animales se adecúan al experimento a realizar dependiendo de condicionamientos técnicos (tamaño), anatómicos (particularidades de la viscera que se estudia), fisiológicos (adecuación fisiológica del experimento), económicos (coste del animal), resistencia, etc.

La posibilidad de la existencia de alternativas al animal de laboratorio en la investigación biomédica, por desgracia, no existe. Sí se dispone de métodos complementarios, no alternativos, que pueden colaborar en la utilización de un menor número de animales; y en algún caso muy concreto quizás sustituir algún tipo de experimento (222).

En este apartado describiré la anatomía de la extremidad posterior del conejo, de forma orientativa, ya que no es mi intención la realización de un estudio anatómico.

El esqueleto de los miembros posteriores lo constituyen básicamente el anillo pelviano y los huesos de las extremidades posteriores. La Pelvis del conejo es muy alargada y está compuesta por la fusión de tres núcleos óseos denominados íleon, isquion y pubis, muy bien fijados al cuerpo del

sacro, con el cual se relacionan, a su vez, con la columna vertebral. El anillo pelviano constituye la base ósea del abdomen, insertándose en el mismo numerosos músculos. El conejo tiene además un rudimento óseo acetabular en la parte inferior del coxal.

En las partes laterales del anillo pelviano figuran dos concavidades -una a cada lado- que son los cóndilos femorales, destinados a alojar la cabeza del fémur de cada miembro.

El Fémur es el hueso más largo y fuerte del conejo; su extremo superior se halla implantado en el cóndilo femoral y unido a éste mediante un ligamento grueso y resistente, articulación que se halla capsulada por una prolongación cartilaginosa.

Por su parte inferior, el fémur se articula con la Tibia mediante cartílagos de conjunción. El Peroné se halla adherido a la tibia hasta más de la mitad de su trayecto descendente, fijándose por un ligamento interóseo. La tibia y el peroné siguen una trayectoria de delante atrás, para finalizar en la articulación del Tarso, elemento que está formado por seis huesos de considerable tamaño, entre los que destacan el Astrágalo y el Calcáneo, el primero es articular y el segundo es importante por fijarse en él el tendón del músculo gastrocnemio (tendón de Aquiles).

A continuación del tarso siguen los cinco huesos de la planta del pie, de los cuales sólo dos presentan un desarrollo notable y estando uno de ellos -el quinto- en la práctica atrofiado. El Pie del conejo cuenta sólo con cuatro dedos, cada uno de los cuales posee tres falanges.

Los huesos articulares de las extremidades posteriores son la rótula y los sesamoideos podales.

Las extremidades posteriores, o patas, tienen una considerable musculatura, correspondiendo a ésta un papel fundamental para los desplazamientos, carrera y salto.

Sobre el hueso coxal se sitúan los músculos: Glúteos (superficial, medio y profundo); Glúteos accesorios; Obturadores; Psoas Mayor; etc.

Sobre el fémur los que dan gran movilidad al muslo: Tríceps Crural (Biceps femoral, Semitendinoso y Semimembranoso); Vasto Largo o Lateral; Vasto Medial; Recto Femoral; Sartorio; Abductores; Gracilis; etc., constituyendo una masa cárnica muy importante.

La pierna tiene como músculo más destacado para la locomoción el Gastrocnemio, que va desde la parte inferior y posterior del fémur hasta la punta del calcáneo; junto con el tendón del Sóleo y del Flexor Superficial de los Dedos forman el Tendón Calcáneo Común (Tendón de Aquiles). El resto de

músculos de la pierna son los Flexores y Extensores de los Dedos.

La irrigación arterial de las extremidades posteriores tiene su origen en la aorta, tras bifurcarse y dar origen a la arteria Iliaca Común. Ésta se divide, a su vez, y de ella nacen la arteria Iliaca Externa e Interna.

La arteria Iliaca Interna da lugar a ramas viscerales y a ramas parietales pelvianas (Glútea Caudal, Pudenda Interna, Caudales, Sacras).

La arteria Iliaca Externa se continúa en la arteria Femoral, la cual, da varias ramas colaterales y dos arterias para la pierna. En la cara posterior (pósterio-interna) se origina la arteria Safena, que da ramas diversas llegando hasta los dedos del pie. Hacia la cara anterior da lugar a la arteria Poplítea que origina la arteria Tibial (ántero-externa), en la tibia, que da ramas en la pierna, tarso, metatarso y arterias para los dedos.

El retorno Venoso se origina en los dedos de los pies, venas Plantares, Safenas (con anastomosis entre la rama externa, llamada safena parva, y la interna, denominándose vena safena magna), Femoral (recibe la safena magna), Iliaca Externa, Iliaca Común (al unirse a la Iliaca Interna) y la Cava Caudal.

El Sistema Linfático comienza en los pies, dando lugar a los Nódulos Linfáticos Poplíteos, Inguinales Superficiales, Hipogástricos, Subiliacos, Iliacos y Lumbares.

La inervación de la extremidad posterior del conejo tiene su inicio en el plexo Lumbo-Sacro, con múltiples ramas, que origina el nervio Ciático, con sus ramas colaterales y dos ramas terminales: nervio Tibial y Peroneal. El tibial se dirige hacia la parte posterior, dando origen al nervio Cutáneo Sural Caudal, nervios Plantares, Metatarsianos Plantares y Digitales Plantares. El peroneal común, anterior-externo, se divide en el nervio Cutáneo Sural Lateral y el nervio Peroneal Superficial y Profundo, nervios Metatarsianos Dorsales y Digitales Dorsales. Son laterales. La cara interna se inerva por el nervio Femoral, dando ramas musculares femorales y el nervio Safeno. También recibe inervación del nervio Pudendo, del Obturador y del Génito-femoral (10,125,194).

1.3. ANATOMÍA DE LA EXTREMIDAD INFERIOR HUMANA

A continuación, describiré la anatomía del miembro inferior en humanos, para poder compararlo con la anatomía sobre la que se ha realizado el experimento.

El miembro inferior está formado, como el miembro superior, por cuatro segmentos: 1º, la cadera; 2º, el muslo; 3º, la pierna; 4º, el pie (177).

La cadera une el miembro inferior al tronco. Comprende un solo hueso, el hueso ilíaco o hueso Coxal. Los huesos ilíacos circunscriben con el sacro y el coxis una cintura ósea, llamada pelvis.

El hueso ilíaco es un hueso plano, ancho, de forma muy irregular, que se ha comparado a las alas de un molino de viento, a una hélice, etc. Se distinguen en este hueso tres segmentos: 1º, un segmento medio, grueso, estrecho y excavado por una cavidad articular, la cavidad cotiloidea; 2º, un segmento superior aplanado y muy ancho, llamado ala ilíaca o ilion; 3º, un segmento inferior que forma el borde o marco de un ancho orificio, el agujero isquio-púbico, llamado de manera impropia agujero obturador; la mitad anterior de este marco óseo está formado por el pubis; la mitad posterior recibe el nombre de isquion.

En el hueso coxal tenemos que describir dos caras, cuatro bordes y cuatro ángulos. En su posición, hacia atrás está el borde que presenta una gran escotadura; hacia fuera, la cavidad hemisférica; hacia abajo, la mayor de las escotaduras que presenta el borde de esta cavidad.

En su cara externa e interna se insertan un gran número de músculos.

El Fémur es un hueso largo que forma por sí solo el esqueleto del muslo. Se articula por arriba con el hueso coxal y por abajo con la tibia. En la posición vertical, el fémur está dirigido en oblicuo de arriba a abajo y de fuera a dentro. Esta oblicuidad está más acentuada en la mujer que en el hombre; esto se debe a que, en la mujer, la pelvis es más ancha y las cavidades cotiloides están más separadas.

En el fémur hay que describir un cuerpo y dos extremidades. El cuerpo es prismático y triangular, tiene tres caras y tres bordes. Las caras son una anterior y otras dos posteriores. Las caras están separadas por dos bordes laterales (interno y externo) y un borde posterior.

La extremidad superior comprende: 1º, una eminencia articular, la cabeza del fémur; 2º, dos eminencias rugosas, el trocánter mayor y el trocánter menor; 3º, un segmento cilindroide, el cuello,

que une la cabeza del fémur a los trocánteres y al cuerpo del fémur. La extremidad inferior es voluminosa y más extensa en sentido transversal que en el antero-posterior. Está dividida en dos eminencias articulares laterales, llamadas cóndilos, separadas una de la otra, por detrás, por una profunda depresión, que es la escotadura intercondílea.

En su posición, el borde cortante del cuerpo del hueso, hacia atrás; la extremidad, acodada, hacia arriba; y la superficie articular, esférica, de esta extremidad, hacia dentro. Para darle su inclinación normal, póngase los dos cóndilos de la extremidad inferior en contacto con un plano horizontal.

El fémur tiene múltiples inserciones musculares anteriores y posteriores.

El agujero nutricio principal del hueso se encuentra en el borde posterior (denominado línea áspera), hacia su parte media o, más arriba, en un punto de la cara interna del hueso, próximo siempre a la línea áspera.

La Rótula, situada en la parte anterior de la rodilla, es un hueso sesamoideo, desarrollado en el tendón del cuádriceps. Es triangular, con la base superior y aplanado de delante a atrás.

El esqueleto de la pierna está constituido por dos huesos largos; uno interno, voluminoso, que es la Tibia; el otro, externo, es el Peroné. La tibia y el peroné están articulados entre sí por sus extremidades y están separados uno del otro en todo el resto de su extensión por un espacio alargado, llamado espacio interóseo.

El pie se compone, como la mano, de tres grupos óseos, que son: el tarso, el metatarso y las falanges.

Los huesos del miembro inferior están unidos entre sí por articulaciones y todas estas articulaciones tienen ligamentos que refuerzan las cápsulas articulares (177).

Los músculos de la región glútea están cubiertos por la Aponeurosis Glútea. Se origina desde la cresta ilíaca, el sacro y el coxis, y se continúa por abajo y por delante con la aponeurosis femoral.

La Aponeurosis Femoral rodea el muslo, formándole una vaina completa. Por arriba y por delante, la aponeurosis se fija en el arco crural y se continúa por fuera y por detrás con la aponeurosis glútea. Por abajo, se prolonga alrededor de la rodilla para fijarse en la rótula y en la tibia. Delgada por delante, por dentro y por detrás, la aponeurosis femoral es muy gruesa por fuera, donde toma el nombre de Fascia Lata. La aponeurosis femoral está unida al fémur por dos láminas fibrosas, los tabiques

intermusculares externo e interno. Emite también por su cara profunda unas expansiones que envuelven a cada uno de los músculos del muslo. La aponeurosis femoral forma a los vasos femorales una vaina fibrosa llamada conducto femoral.

La pierna está rodeada por una Vaina Aponeurótica, interrumpida sólo a nivel de la cara interna de la tibia, donde la aponeurosis se confunde con el periostio. La extremidad superior de la aponeurosis tibial se adhiere por delante al peroné y a las tuberosidades de la tibia; recibe las expansiones tendinosas de ciertos músculos del muslo. Por detrás y por arriba, la aponeurosis de la pierna se continúa con la aponeurosis del muslo. La aponeurosis de la pierna forma, alrededor de la vena safena externa, en la mitad superior de la pierna, un conducto aponeurótico. La extremidad inferior de la aponeurosis de la pierna se continúa con las aponeurosis del pie. De la cara profunda de la aponeurosis tibial parten dos tabiques fibrosos intermusculares: externo (separa la región antero-externa de la posterior de la pierna) y anterior (divide la región ántero-externa de la pierna en dos celdas).

Debajo del tríceps sural se encuentra una lámina aponeurótica profunda, extendida entre el borde interno de la tibia y el borde externo del peroné.

La Aponeurosis del Pie se divide en: 1) aponeurosis dorsales y 2) aponeurosis plantares (177).

La sangre arterial llega al miembro inferior: 1º, por la arteria femoral; 2º, por las ramas parietales extrapelvianas de la arteria hipogástrico (177).

La Arteria Hipogástrica o Iliaca Interna (bifurcación interna de la Iliaca Primitiva), da doce ramas repartidas en tres grupos: 1.- las ramas viscerales; 2.- las ramas parietales intrapelvianas; 3.- las ramas parietales extrapelvianas.

Las ramas extrapelvianas salen de la cavidad pelviana y contribuyen a la vascularización del miembro inferior. Son: **a)** la arteria obturatriz (da tres ramas); **b)** la arteria glútea (da dos ramas); **c)** la arteria isquiática (da cuatro ramas); **d)** la arteria pudenda interna.

La Arteria Femoral sigue a la arteria Iliaca Externa. Sus ramas colaterales principales son: **a)** la subcutánea abdominal; **b)** la circunfleja iliaca superficial; **c)** la pudenda externa superior; **d)** la pudenda externa inferior; **e)** la anastomótica mayor; **f)** la femoral profunda (da las ramas: arteria del cuádriceps, la circunfleja anterior, la circunfleja posterior y las perforantes).

La Arteria Poplítea sigue a la arteria femoral, de la que es continuación. Da ramas colaterales y las

arterias gemelas. En su parte inferior da la arteria tibial anterior y el tronco tibio-peroneo.

La Arteria Tibial Anterior es la rama de bifurcación anterior de la arteria poplítea y la Arteria Pedia es continuación de ésta. El Tronco Tibio-Peroneo es la rama posterior de la bifurcación de la arteria poplítea. Da las ramas colaterales recurrente tibial interna y la arteria nutricia de la tibia.

La Arteria Peronea es la rama externa de la bifurcación del tronco tibio-peroneo. Da ramas colaterales musculares, la arteria nutricia del peroné y un ramo anastomótico transversal.

La Arteria Tibial Posterior es la rama interna de la bifurcación del tronco tibio-peroneo, es mucho más voluminosa que la arteria peronea. La arteria tibial posterior se divide en el canal calcáneo en dos ramas terminales: 1.- Arteria Plantar Externa, y 2.- Arteria Plantar Interna (para el primer dedo).

Las Venas del miembro inferior se las puede dividir en dos grupos: 1.- las Venas Tributarias de la Iliaca Interna: la vena obturatriz, glútea, isquiática y pudenda interna.

2.- las Venas Tributarias de la Iliaca Externa, propiamente dichas del miembro inferior: se dividen en venas profundas y venas superficiales, según que estén situadas por debajo o por encima de la aponeurosis superficial.

Las venas profundas, a excepción del tronco venoso tibio-peroneo, de la vena poplítea y de la vena femoral, son dos por cada arteria. Reciben el nombre de la arteria a la cual acompañan y tienen múltiples anastomosis. Todas poseen válvulas.

Las venas superficiales forman en el tejido celular subcutáneo una red venosa cuya sangre se vierte en dos troncos colectores, que son las venas safenas interna y externa. La red venosa del pie es el origen de las venas safenas. La Safena Interna se origina por delante del maleolo interno y desemboca en la femoral (cayado de la safena). Recibe diversas colaterales y tiene múltiples anastomosis en su recorrido. Presenta de cuatro a veinte válvulas en su interior y la ostial siempre es constante. La Safena Externa tiene su inicio por detrás del maleolo externo y desemboca en la cara posterior de la vena poplítea (cayado de la safena externa) a nivel de la interlínea articular. Recibe diversas colaterales y tiene múltiples anastomosis (177).

Los Grupos Ganglionares principales del miembro inferior son, de abajo a arriba, los ganglios poplíteos y los inguinales. Los vasos linfáticos son superficiales y profundos, con los ganglios secundarios (177).

Los Nervios del miembro inferior proceden del Plexo Lumbar y del Plexo Sacro. El Plexo Lumbar da ramas colaterales y seis ramas terminales (el Nervio Crural es el más voluminoso). El Plexo Sacro da seis ramas colaterales y una rama terminal (Nervio Ciático Mayor). El Nervio Ciático es el más voluminoso del organismo. Da siete ramas colaterales y dos ramas terminales (ciático poplíteo externo e interno). El Ciático Poplíteo Externo inerva los músculos y tegumentos de la región ántero-externa de la pierna y dorsal del pie. Da cuatro ramas colaterales y dos ramas terminales. El Ciático Poplíteo Interno es más voluminoso y está destinado a los músculos de la pierna y planta del pie. Emite cinco ramas colaterales musculares, un ramo posterior de la rodilla y el nervio safeno externo.

El Nervio Tibial Posterior sigue al ciático poplíteo interno en el anillo del sóleo. Da ramos musculares, un ramo articular y el Nervio Calcáneo Interno.

En el pie están el Nervio Plantar Interno (con una rama interna y otra externa), el Nervio Plantar Externo (con un ramo superficial y otro profundo) y los Nervios de los dedos (177).

1.4. BIOQUÍMICA: FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

La energía química o potencial de las sustancias alimentarias se encuentra en las uniones covalentes entre los átomos de una molécula. Durante la hidrólisis de uniones químicas típicas se produce la liberación de unas 3 000 calorías por mol. Dentro de la célula viviente esta energía no se libera de forma súbita, sino de un modo gradual y controlado, mediante la intervención de gran cantidad de enzimas que convierten al final el combustible en CO_2 y H_2O (51).

La energía liberada puede ser utilizada por la célula en: 1) sintetizar nuevas moléculas, por medio de reacciones endergónicas, para reemplazar a otras o para el crecimiento y metabolismo normal celular; 2) realizar trabajos mecánicos, como la división celular, la citolisis o la contracción muscular; 3) efectuar el transporte activo en contra de un gradiente osmótico o iónico; 4) mantener los potenciales de membrana, como la conducción y transmisión de impulsos nerviosos; 5) secreción celular; 6) producir energía radiante (bioluminiscencia). Sólo en las reacciones del primer grupo la energía proporcionada por las sustancias alimentarias se transforma en uniones químicas de energía. En los otros cinco tipos de reacciones hay una transformación de energía química en otras formas de energía.

Entre todas estas transformaciones existe un eslabón común, el compuesto adenosintrifosfato (ATP). El ATP se encuentra en todas las células y tiene como característica química principal la de poseer dos uniones terminales, con un potencial energético mucho más alto que todas las otras uniones químicas. El ATP está compuesto por la base púrica adenina, una ribosa y tres moléculas de ácido fosfórico (la adenina más la ribosa forman el nucleósido adenosina). El ATP se puede transformar en adenosindifosfato (ADP) y adenosinmonofosfato (AMP), principalmente, pero también en citosintrifosfato (CTP), uridintrifosfato (UTP) y guanosintrifosfato (GPT). La liberación de cualquiera de los fosfatos terminales de ATP produce 7 300 calorías por mol, en lugar de las 3 000 calorías de las uniones químicas comunes. La unión al fósforo de alta energía permite a la célula acumular una gran cantidad de energía en muy pequeño espacio y tenerla lista para ser usada tan pronto como la necesite (51).

La glucólisis es el primer paso en la liberación de energía. En condiciones anaeróbicas la glucosa es

degradada a lactato por un proceso denominado glucolisis (49,51). La glucolisis se realiza por una serie de 10 enzimas, todas ellas localizadas en el citosol, y el producto de una enzima sirve de sustrato para la reacción siguiente. La producción de energía neta de esta cadena de reacciones es de dos moléculas de ATP y piruvato, a partir de una glucosa (13,51). En condiciones anaeróbicas el piruvato es usado como aceptor de hidrógeno y convertido en lactato. Si la glucolisis tiene lugar en condiciones aeróbicas los productos finales son piruvato y coenzima NADH, que contiene poca energía.

El piruvato contiene gran cantidad de energía, tras producir lactato, y experimenta una nueva degradación, pero esta vez dentro de la mitocondria. Esto se realiza en dos pasos consecutivos: el ciclo de Krebs o del ácido tricarboxílico y la **fosforilación oxidativa**. El piruvato entra de manera directa en la matriz mitocondrial y es convertido en acetil-coenzima A por la enzima piruvato deshidrogenasa. La NADH no puede penetrar de forma directa en la matriz y sus electrones son transferidos al dihidroxiacetona fosfato, que los pasa a la mitocondria por un mecanismo de transporte (35,39,51).

En el caso de organismos anaeróbicos y de tejidos, como el músculo esquelético, que pueden funcionar cierto tiempo en condiciones anaeróbicas, la glucolisis es la principal fuente de energía (32,51). En este punto es interesante mencionar el balance energético general que es el resultado de la función de las mitocondrias (49,141,168). De las 686 000 calorías que contiene una molécula de glucosa, menos del 10% (es decir, 58 000) pueden ser liberadas por glucolisis anaeróbica. Una cantidad mucho mayor de esta energía es liberada por **fosforilación oxidativa** (51).

El ciclo de Krebs, también se le denomina ciclo del ácido tricarboxílico o del ácido cítrico, tiene lugar en la matriz mitocondrial. Sirve como primer paso de una vía común para la degradación de las moléculas combustibles. En el citoplasma celular estas sustancias son modificadas metabólicamente, produciendo grupos acetilo, que entran en la mitocondria. En una primera etapa, los grupos acetilo, unidos a la acetil-coenzima A, son incorporados al ciclo de Krebs (penetran moléculas de CO_2 y protones, H^+). En la segunda etapa, los H^+ son captados por la cadena respiratoria y se combinan con O_2 para formar H_2O . Este proceso genera también ATP por la fosforilación de ADP (51,71).

El sistema de transporte electrónico de la mitocondria se acopla en tres puntos con el sistema de fosforilación. Los protones (H^+) son traslocados a través de la membrana, del lado M (matriz) al lado C (citosol) por medio de la cadena respiratoria. De acuerdo con la hipótesis quimio-osmótica (de Peter Mitchel: por cada par de electrones provenientes del ciclo de Krebs que es transportado por el sistema de transferencia de electrones, la ATP-asa sintetiza una molécula de ATP), esta traslocación crea una diferencia de pH y un potencial de membrana. Ambos gradientes constituyen la fuerza motora de los protones que tienden a mover el H^+ de vuelta, desde el lado C al M de la membrana. Puesto que la membrana mitocondrial interna es muy impermeable a los iones H^+ , éstos sólo pueden pasar al lado M a través del "canal de protones" de la ATP-asa mitocondrial (es un complejo multipolipeptídico). Cuando los H^+ se mueven del lado C al M, la ATP-asa, operando en forma inversa, cataliza la síntesis de ATP. Por cada NADH que es oxidada se traslocan 6 protones, los cuales al volver al lado M darán origen a 3 moléculas de ATP. La formación de ATP, en la cadena de electrones, se produce en tres pasos sucesivos.

El balance energético de la respiración aeróbica muestra que se producen 36 moléculas de ATP a partir de cada molécula de glucosa. La célula acumula el 40% de la energía química liberada por la combustión de glucosa en forma de ATP. El resto de la energía se disipa en forma de calor o es utilizada en otras funciones celulares (51,77,88).

Como las actividades metabólicas más importantes de las mitocondrias ocurren dentro del compartimento interno, debe existir un flujo rápido y activo de ciertos metabolitos a través de las dos membranas. Por ejemplo, los productos del metabolismo extramitocondrial deben llegar a la matriz mitocondrial para ser oxidados, de la misma manera que el ADP y el fosfato para formar ATP. De forma simultánea, los productos finales, como H_2O , ATP, urea y amoníaco, deben abandonar la mitocondria (51).

Las membranas mitocondriales presentan importantes diferencias en cuanto a su permeabilidad. La membrana externa es permeable de manera libre a los electrolitos, agua, sacarosa y moléculas de hasta 10 000 daltons; por otra parte, la membrana interna suele ser impermeable a los iones y a la sacarosa en condiciones normales.

La membrana interna de la mitocondria utiliza transportadores (carriers) específicos para el paso de diversas sustancias (51).

Los transportadores más importantes son los que intervienen en el paso de ATP, ADP y fosfato inorgánico (Pi), lo que permite la entrada de ADP y Pi a la matriz mitocondrial y la salida de ATP al citosol (son transportadores específicos) (51). El estudio de la traslocación ADP-ATP es facilitado por el hecho de que hay inhibidores específicos para el transporte, lo que ha permitido sugerir un modelo de poro como el más probable. El componente eléctrico de los distintos gradientes parece ser el más importante para el transporte del ATP (8). En experimentos recientes, se ha comprobado un efecto modulador en el transporte del ATP mediante canales sensibles al calcio en células musculares (32) y al potasio en células miocárdicas, en células β del páncreas y en otros receptores (96,110,175). Los gránulos cromafines se han utilizado como un modelo excelente en los estudios del transporte de nucleótidos (8,186).

La conformación interna de las mitocondrias puede variar entre dos estados extremos. Uno, es el estado ortodoxo (en tejidos intactos); el otro, corresponde al estado condensado, en el cual hay una contracción intensa del compartimento mitocondrial interno, con acumulación de líquidos en el externo. En la conformación ortodoxa la membrana interna presenta las características crestas, la matriz ocupa casi todo el volumen de la mitocondria y tiene aspecto granular o reticular. En la conformación condensada el plegamiento de la membrana interna se realiza al azar y la matriz, ahora más homogénea, representa sólo cerca del 50% del volumen mitocondrial. En ciertos puntos se observa la existencia de uniones de contacto entre ambas membranas de la mitocondria (más abundantes en la conformación condensada). Se ha propuesto una función reguladora, que intervendría en el intercambio ATP/ADP a través de las dos membranas mitocondriales (51).

El funcionamiento del sistema de transporte electrónico se considera necesario para que pueda llevarse a cabo la transformación del estado condensado al ortodoxo. La inhibición de la cadena respiratoria impide esa transformación. El estado ortodoxo se produce cuando el ADP externo disminuye y, por consiguiente, no hay sustrato para la fosforilación. Si en este momento se agrega ADP, la respiración aumenta muy rápido y tiene lugar la contracción de la membrana interna. En ausencia de ADP el volumen de las mitocondrias puede aumentar entre tres y cinco veces con respecto a su valor normal. La adición de ATP o la reanudación del mecanismo respiratorio permiten que la mitocondria recupere su tamaño original (51,168).

Si bien **la respiración y la fosforilación oxidativa** son las funciones mitocondriales más importantes, las mitocondrias están relacionadas, también, con la incorporación y eliminación de sustancias intracelulares. Se acumulan los iones calcio y fosfato (son agentes productores de hinchamiento), succinato, glutamato, isocitrato, aspartato, manganeso y bicarbonato. Y pueden expulsar de manera activa agua y pequeñas moléculas, en la proporción de varios cientos por cada molécula de ATP utilizada (la incorporación de agua a la mitocondria está asociada con el desacoplamiento de la **fosforilación oxidativa**) (51).

1.5. ETIOPATOGENIA

En la actualidad, los traumatismos constituyen la causa principal y única que permite la realización de reimplantes de las extremidades.

Las amputaciones traumáticas constituyen un 12% del total de amputaciones (en países occidentales). Y los traumatismos que producen amputaciones o avulsiones, totales o parciales, ocurren en su mayoría a nivel laboral y por accidentes de circulación.

Los accidentes laborales afectan a la extremidad superior en mayor proporción, no ocurriendo lo mismo en accidentes de circulación.

Las avulsiones extensas de la extremidad inferior no son, hoy día, un acontecimiento raro. Sin embargo, la cantidad de informaciónn disponible sobre este tema es escasa.

Las avulsiones importantes de la extremidad inferior son causadas, ante todo, por accidentes de vehículos de motor. Si bien las motos y los coches explican un gran número de casos, las heridas de la extremidad inferior que son resultado de atropello por un autobús o camión son las más severas. Ello es debido a que los 2 neumáticos posteriores de estos vehículos reparten la fuerza motriz sobre una extensa superficie (2,93).

La herida por avulsión común de la pierna es la más frecuente y produce una herida abierta, con destrucción de la piel y el tejido celular subcutáneo, con tejido macerado a su alrededor, roturas o contusiones vásculo-nerviosas, laceración y aplastamiento muscular variable y fracturas en un 80% (93).

La herida por avulsión atípica de la pierna se produce por atropello de camiones y no está bien documentada. La piel y el tejido celular subcutáneo tienen pequeñas heridas pero se asocia a un gran despegamiento de dichos tejidos y de tejidos más profundos de la extremidad. Se asocia a extensas lesiones musculares y fracturas (93).

El tercer tipo de herida por avulsión es la avulsión plantar. Tiene 2 tipos de lesiones: **1) avulsión completa**, con rotura de los músculos y fracturas diversas. Se suele asociar, a veces, a la amputación distal del pie; **2) avulsión parcial**, con una base proximal o distal de colgajo, congestión blanda, hemorragia subcutánea en la parte distal del colgajo y color rojo. Pero es engañosa, pues con frecuencia se necrosa (93,98).

La amputación de una extremidad es uno de los procedimientos más antiguos de la cirugía, sólo se empleaba como método desesperado y, a menudo, insatisfactorio para salvar la vida. En la actualidad, se usa no sólo para este propósito sino para crear un muñón que, cuando se adapta con una prótesis, restaura al máximo grado posible la función del miembro (7).

Se requiere la amputación en un traumatismo cuando la cirugía conservadora o reparadora no ofrece una posibilidad razonable de restauración funcional (7,188).

Pero hoy día, hay que intentar el reimplante quirúrgico de la extremidad amputada, parcial o totalmente, con rehabilitación posterior del paciente, ya que las nuevas técnicas de microcirugía y los instrumentales, así como los aparatos de seguimiento y control post-quirúrgico, nos permiten obtener buenos resultados.

La experiencia indica con claridad que las heridas cortantes son más favorables para el reimplante inicial y el buen resultado a largo plazo. En general, las heridas por arrancamiento tienen una regeneración nerviosa menos completa, mayor daño óseo-muscular y lesiones vasculares más importantes, y la reimplantación es más dificultosa y con menor éxito. Las heridas que se consideren demasiado sucias para un cierre primario, no deben aceptarse para el reimplante (5,54,93).

La herida de una amputación traumática es raro que sea una incisión limpia y la reimplantación incluye algo más que acoplar sólo los extremos de estructuras divididas. Más que en ninguna otra operación, la restauración quirúrgica de una extremidad amputada requiere conocimiento de la curación de las heridas (factores que la influyen y tiempo necesario); la observación de que la infección es la causa principal del fracaso temprano después de reimplantar extremidades, lo que pone de relieve la necesidad de conocer la microbiología quirúrgica (reducir al mínimo, descubrir y tratar la infección). Un problema básico de la reimplantación es el fenómeno de la isquemia y el restablecimiento de la circulación (5,54).

A.- Isquemia

El conocimiento actual del proceso subsiguiente a la interrupción del flujo vascular se debe a los estudios de múltiples investigadores, los cuales nos han permitido conocer los cambios ocurridos como consecuencia de la isquemia.

Unos estudios han sido realizados en seres humanos (70,98,115) y en otras investigaciones el material de estudio se ha obtenido mediante la creación de modelos experimentales (176,209,216). Los descubrimientos de estas investigaciones permiten comprender mejor los aspectos patogénicos. La secuencia en la respuesta tisular y celular en el hombre es bastante similar a la observada en los animales (183,212,232), aunque la experiencia acumulada a lo largo de los años ha demostrado que no existe ningún modelo experimental equiparable por igual al humano y que sólo en alguno de sus aspectos evolucionan de la misma manera (68,90,111). En el ser humano, el grado y la extensión del proceso reparativo pueden ser modificados de manera muy amplia, por la propia lesión y por el uso de medicación.

Cuando el riego sanguíneo de una extremidad se ha interrumpido por completo (como en una amputación traumática), el oxígeno disponible se agota rápido y comienza el metabolismo anaerobio (51,184). Al final, se llega a un estado irreversible cuando el restablecimiento de la circulación sanguínea ya no logra la recuperación. El tiempo transcurrido entre el comienzo de la isquemia y la etapa de irreversibilidad varía mucho según los tejidos (193). El músculo esquelético es el tejido de una extremidad más sensible a la isquemia (113,134,183), seguido por los nervios (130), la piel, la grasa y el hueso. Si hay presión e isquemia (síndrome compartimental), se afecta primero el nervio (134,152,176).

La mayoría de los experimentos que han estudiado el tiempo máximo de tolerancia a la isquemia se han realizado restableciendo el flujo sanguíneo después de diversos periodos de isquemia y observando los cambios morfológicos, fisiológicos o bioquímicos acaecidos.

El tejido muscular ha sido estudiado mediante métodos muy diversos -incluyendo la histoquímica (44,120,163), la bioquímica (89,181,183), el microscopio óptico (68,92,161), el microscopio electrónico (120,158,161), la electromiografía (115,134,216), la espectroscopia con resonancia nuclear magnética (1,31,65,66), la cromatografía líquida (19,179,210)- para comprobar estos cambios.

a) Cambios Morfológicos

Se han descrito diferentes cambios histológicos en los músculos isquémicos utilizando microscopía óptica (68,163,197) y electrónica (92,180,205), observándose diferencias según las

especies en cuanto a resistencia del músculo a la isquemia.

Con el microscopio óptico, en experimentos realizados a temperatura ambiente e isquemia de extremidades de 3 horas en ratas (68), por oclusión arterial, y de 2 horas en conejos (163), por un manguito, se han observado intensos cambios musculares, evidenciados por la pérdida de la estriación transversal, fragmentación de las fibras e inflamación de las mismas, con focos de necrosis. Los músculos que presentan estos cambios pueden clasificarse como dañados de forma intensa, pues las células musculares no sobrevivirán (68,163).

Van Alphen (220) descubrió que la necrosis focal, la degeneración hialina y los procesos de regeneración eran las manifestaciones más características en los músculos reimplantados después de una isquemia fría de 12 horas.

El número de fibras con degeneración discoide y degeneración hialina encontradas tras una isquemia, con supervivencia del músculo de 1 ó más días, se correlacionan con el fracaso en la recuperación de la contractilidad (111).

Petrasek (164), en experimentos con conejos, observó que las fibras musculares de contracción rápida tenían más lesión que las fibras de contracción lenta, sólo manifestado en isquemias superiores a 5 horas.

Con el microscopio electrónico los cambios isquémicos encontrados han sido anomalías mitocondriales (como hinchazón y desorganización de las crestas) (83,88), un ensanchamiento de los espacios interfibrilares, hinchazón del retículo sarcoplásmico, pérdida de los gránulos de glucógeno, aumento de las gotitas de lípidos, cuerpos densos intramitocondriales y desorganización de la estructura fibrilar (111,207,209).

Otros autores (90,183) han descrito cambios degenerativos ultraestructurales parecidos tras isquemias musculares de 3 horas: degeneración intensa de la estriación transversal, disolución de las líneas Z y pérdida de la distinción de las bandas A-I; hinchazón mitocondrial intensa y desorganización de las crestas; densidades floculares intramitocondriales; inclusiones de placas trilaminares intramitocondriales, y fagocitosis de elementos miofibrilares por leucocitos polimorfonucleares.

La lesión muscular causada por la isquemia tiene un componente primario y un componente secundario (183). La lesión aguda (primaria) celular se relaciona con el daño metabólico inmediato,

que se produce durante la aplicación de un torniquete. Si este daño inicial es grave, se ponen en marcha procesos patológicos que pueden originar una lesión tisular adicional (secundaria) después de soltar el torniquete.

Lesión Primaria: se observan signos precoces de lesión morfológica primaria de las células musculares después de 1 hora de isquemia y, en ocasiones, después de media hora (158,180). Con tiempos de torniquete más largos, estos cambios se hacen más extensos y severos. La degeneración focal miofibrilar y la necrosis celular se ven después de 2 ó 3 horas de isquemia (44,68,90) y se hacen más difusas, de manera progresiva, con la duración creciente de la isquemia (180,209).

La lesión isquémica primaria del músculo se manifestó, también, por una permeabilidad anormal inmediata de la membrana celular para las enzimas del citoplasma (212), permitiéndolas salir a los espacios extracelular y vascular (167). En el músculo esquelético, así como en el músculo cardíaco, la elevación de los niveles séricos de la creatín fosfokinasa se relaciona de forma estrecha con la duración del daño isquémico y con el grado de lesión tisular (90,100,183). El aumento de los niveles de creatín fosfokinasa no se produce, por lo general, durante la primera hora de isquemia de una extremidad, pero se han observado elevaciones significativas después de 2 ó 3 horas de isquemia (90,212). La medición de los niveles séricos de la creatín fosfokinasa es muy útil en los estudios con torniquete, ya que la creatín fosfokinasa es responsable del daño del músculo situado debajo del manguito así como del músculo distal a éste (127,159,161).

Lesión Secundaria: Las manifestaciones morfológicas del daño a las células musculares llegan a ser más evidentes y más extensas con el paso del tiempo, después del daño verdadero primario, llegando al máximo dentro de las 24 horas posteriores a la suelta del torniquete, por lo general (44,68,132). En parte, es debida a que la desorganización celular y la autólisis de la lesión primaria no es instantánea, pues le lleva tiempo desarrollarse con plenitud (159,183). Sin embargo, muchos investigadores han proporcionado pruebas, en la actualidad, indicando que una parte significativa del retraso en los cambios morfológicos, siguiendo a la aplicación prolongada de un torniquete, representa la progresión secundaria del daño celular, a pesar de la revascularización (90,161,183).

Después de periodos de isquemia prolongados, la revascularización de la extremidad y la entrada de moléculas de oxígeno originan productos tóxicos (157), tales como los radicales de oxígeno

y el peróxido de hidrógeno (71,73). Estos radicales libres (originados por la degradación enzimática mediada por la xantina oxidasa de las células endoteliales vasculares) inducen la peroxidación de las membranas lipídicas y un aumento de la permeabilidad vascular (81). Incrementos de la actividad de la xantina oxidasa se aprecian a las 2 horas de una isquemia muscular. Por otra parte, los neutrófilos (27,91,101) contribuyen a la formación de los radicales libres. La activación de los neutrófilos incrementa el consumo de oxígeno y se asocian con una mayor mortalidad por shock. La activación de los leucocitos se produce por lesiones a nivel endotelial (116,126) o por efectos mecánicos. Una manera de evitar la producción de estos radicales libres consiste en un mayor control de la reperfusión (15,100), la utilización de antioxidantes (81), la inhibición de la activación de los leucocitos (117,156,235) o la producción de óxido nítrico (117,157).

b) Cambios Bioquímicos

Los pocos estudios metabólicos relevantes que se han concentrado en los acontecimientos intracelulares han demostrado, por lo general, una recuperación metabólica más rápida en el músculo, después de la suelta de un torniquete, de lo que los parámetros extracelulares han dado a entender (89,142,155), pero hay todavía discrepancias en la velocidad exacta de la reconstrucción celular (80,122). Los resultados conflictivos son, casi siempre, inevitables, debido a que los métodos empleados en estas investigaciones han sido la biopsia muscular (técnica difícil y de naturaleza invasiva) y las técnicas de ensayo de los metabolitos tisulares. Además, estos estudios no han intentado relacionar la alteración metabólica y su recuperación con el grado de lesión tisular debido a la isquemia (183).

Avances recientes en la utilización de la espectroscopia del fósforo-31 con resonancia nuclear magnética (40,181,182), de gran rendimiento, nos ha permitido controlar de forma no invasiva el metabolismo energético celular y su pH en el músculo "in vivo", durante la isquemia y la revascularización (139,183,184,214).

El estado bioenergético de las células vivas puede ser caracterizado, de forma cuantitativa, mediante el equilibrio entre los metabolitos del fosfato de alta energía, tal como la proporción entre la PCr y el ATP (1) o entre la PCr y el Pi (39). Los cambios en los niveles relativos de PCr y el Pi ocurren casi de inmediato como respuesta a la isquemia y a la revascularización (183,184). En un

experimento con 3 horas de torniquete, los datos de la RNM muestran una degradación de la PCr con un incremento concomitante del Pi, evidentes dentro de los 5 minutos posteriores al inflado del torniquete y continuó durante el tiempo en que el músculo permaneció isquémico (183). Una inversión rápida de estos cambios ocurrió con la revascularización. La resíntesis de PCr se detectó, por lo general, dentro de los 10 segundos posteriores a la liberación del torniquete, siendo completada poco después, necesitando 1 minuto por cada hora precedente de isquemia continua. La fosforilación oxidativa es el único medio por el cual se puede mantener una resíntesis tan rápida de PCr dentro de la célula, indicando que hubo una reanudación rápida de la entrada de oxígeno en la mitocondria y que la función enzimática oxidativa estaba intacta (183). No se observaron cambios significativos en los niveles celulares de ATP en ningún momento. Esto demuestra la capacidad de la PCr como depósito de fosfatos de alta energía y la capacidad glucolítica del músculo esquelético (indicado por un aumento progresivo de los glucofosfatos durante la isquemia).

En la isquemia normotérmica, la degradación significativa del ATP no comienza hasta que la reserva energética crucial de PCr está casi agotada (24,99,182). Las 3 horas de isquemia deben estar muy cerca de ese punto en el músculo del perro, ya que la PCr se agotó en un 95% (183).

Hoult et al (99), utilizando técnicas de RNM, mostraron que tras la amputación de la extremidad de una rata los niveles musculares de PCr descendían en 1 1/2 horas y el ATP un 50% a las 3 horas, con descenso del pH más manifiesto al comenzar el metabolismo anaerobio al desaparecer la PCr.

En otros experimentos (183,184), se ha observado una pequeña, pero con significación estadística, alcalinización del citoplasma celular durante los 30 primeros minutos post-isquemia. La alcalinización isquémica inicial se piensa que es debida al consumo de protones de la hidrólisis de PCr, a pesar de la mínima actividad glucolítica inicial (66). Siguiendo a esta leve alcalinización, el pH celular cayó por debajo de la línea basal después de 1 hora de isquemia y continuó el descenso con rapidez con posterioridad. El valor máximo del descenso del pH se observó con 3 horas de isquemia, cuando la velocidad de disminución de la PCr estaba enlenteciéndose y la actividad glucolítica (indicada por los niveles de glucofosfatos) estaba en su punto máximo. El valor del pH era de 6,35 con una acidosis celular grave (183).

Chiu et al (43) midieron incrementos en los niveles de CPK en la sangre de la vena femoral de

perros después de un periodo de isquemia de 2 a 3 horas con torniquete (escape celular post-isquémico). Y el pH medido a las 3 y 6 horas de isquemia tenía unos valores respectivos de 6,76 y 6,12.

El pH muscular ha sido relacionado en la práctica clínica con la producción de ácido láctico y pirúvico y con las diferencias arterio-venosas de oxígeno. En un modelo experimental en ratas, el pH muscular reflejó un cambio desde la fosforilación oxidativa a la glucólisis anaerobia después de una hora y media de isquemia normotérmica (212).

Esta observación sugiere que para la cirugía de reimplante puede ser posible el predecir la probabilidad de viabilidad del tejido muscular, de una extremidad, mediante la medición del pH muscular en el quirófano. Una cifra de pH por debajo de un cierto valor podría indicar la realización de una amputación mejor que el reimplante. Un pH muscular inferior a 6,5 sería incompatible con la supervivencia del tejido (212).

Por motivos obvios, la extensión del periodo tolerable de isquemia de la extremidad es muy importante y deseable para la reimplantación. El agente más viejo y el más utilizado para lograrlo es la hipotermia (184,219), ya que disminuye los procesos metabólicos.

Allen (3,4), en 1930, fué el primero en realizar estudios sobre los efectos de la temperatura en la tolerancia de los tejidos de la extremidad a la isquemia.

En experimentos realizados con perros (212) se ha comprobado el deterioro metabólico de una extremidad posterior amputada y conservada, durante 6 horas, en agua helada, en refrigerador a 4°C y a temperatura ambiente de 25°C. Tras reimplantarla, los animales cuyas patas se conservaron en agua helada sobrevivieron todos, el 80% con conservación del miembro en refrigerador y el 50% con conservación a temperatura ambiente. Por lo que es justo asumir que el límite de tiempo de isquemia de una extremidad amputada y conservada en agua helada está entre 6 y 12 horas (212).

Otros autores (5,57,184) confirmaron que mediante el enfriamiento de una extremidad amputada, en animales de experimentación, disminuía la posibilidad de una "toxemia post-reimplante".

B.- Revascularización

El reimplante de extremidades después de prolongados períodos de isquemia puede ser viable en muchos casos, pero la funcionalidad del miembro es, a menudo, escasa debido a la producción de un síndrome compartimental y una toxemia del reimplante, que compromete la viabilidad y la función neuro-muscular (111).

Cuando se restablece el curso de la sangre en una extremidad isquémica, el flujo arterial femoral aumenta de forma rápida hasta un nivel superior al que tenía antes de la amputación. Además, se aprecia un aumento neto de la hemorragia por los extremos distales musculares, con un enrojecimiento visible de la piel (por una hiperemia reactiva). Se produce un aumento del peso de la extremidad, al mismo tiempo, durante dos horas; después, el aumento es muy lento durante una semana; más tarde, el edema empieza a ceder (201).

No está claro el papel que desempeña la interrupción linfática en la formación del edema, pero hay datos que indican que la reconstrucción de las vías linfáticas disminuye el edema (199).

El efecto general principal del restablecimiento del riego sanguíneo en una extremidad reimplantada es la aparición de un shock, que se ha denominado "toxemia del reimplante" (5,86,134). Esta toxemia no es uniforme en su aparición, pero se ha descrito tanto en clínica (135) como en experimentos (176,183,219).

En el reimplante y en el trasplante la circulación es devuelta al músculo isquémico por las anastomosis vasculares.

Diferentes estudios de la microcirculación de la piel y del músculo demuestran que, después de la isquemia, el restablecimiento del flujo en vasos grandes no va acompañado de un flujo uniforme en la microcirculación. Se ha descubierto que después de la isquemia por un torniquete el flujo sanguíneo no retornaba de inmediato a todas las áreas que habían permanecido isquémicas, originando defectos o áreas de no reflujo (209).

La extremidad inferior puede ser dividida en 3 áreas anatómicas en lo referente al riego sanguíneo: Muslo, Pierna y Pie (29,69,213). Se ha practicado dicha división por los múltiples estudios de la circulación efectuados para la realización de trasplantes músculo-cutáneos pediculados (2,34,78,202).

El reimplante o la revascularización de un segmento de un miembro que incluye una masa muscular

importante puede ser un procedimiento peligroso e incluso representar un riesgo vital para el paciente. Este hecho está relacionado de manera directa con la duración de la anoxia muscular, la cual puede ser responsable de un síndrome de liberación del torniquete con su riesgo asociado de falla múltiple de las funciones vitales. Una vez que la vascularización ha sido restablecida, todos los esfuerzos deben dirigirse a la conservación de un flujo sanguíneo óptimo y a evitar una isquemia secundaria del miembro reimplantado, debida al aumento de la presión en los compartimentos musculares, asociada al edema postraumático y postanóxico (síndrome compartimental) (140).

1.6. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

A.- OBJETIVOS

El estudio aquí realizado se emprendió con dos objetivos:

1.- conocer el grado óptimo de enfriamiento de los tejidos, mediante la técnica de la hipotermia intermedia, que minimice el deterioro metabólico del músculo esquelético isquémico y la manera más sencilla de mantener este grado de hipotermia en el medio clínico.

2.- el estudio de los fosfatos de alta energía, como pronosticadores del éxito del reimplante de una extremidad, mediante espectroscopia del P-31 con R.N.M (resonancia nuclear magnética) y H.P.L.C (cromatografía líquida de alta presión), y su verificación mediante el estudio serológico e histoquímico del músculo y su capacidad de respuesta funcional con la estimulación neuromuscular de la extremidad.

B.- HIPÓTESIS DE TRABAJO

Si el enfriamiento de una extremidad durante un periodo de horas variable es básico para el éxito de un reimplante, ya que origina una disminución del metabolismo energético celular y una menor acidosis, sobre todo de las células musculares, con un descenso en los niveles de los fosfatos de alta energía y una pérdida de la capacidad de recuperación de las células musculares y de su poder de contracción, **Entonces**, durante qué periodo de tiempo de isquemia la utilización de un método de hipotermia que disminuya la temperatura de los tejidos sin congelarlos, la hipotermia intermedia, será más efectiva que el enfriamiento con suero a otras temperaturas para evitar la pérdida de los fosfatos ricos en energía y para que haya una mejor regeneración de las fibras musculares y de la respuesta neuromuscular.

II.- MATERIAL Y MÉTODO

2.1. GENERALIDADES

El trabajo ha sido realizado en la Unidad de Investigación Clínico-Experimental del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

1) Animales de experimentación: 34 conejos machos, raza Neozelandesa, de 3 a 4,5 Kgs. de peso. Se han dividido en 9 grupos, de 3 animales cada uno, para un total de 27 conejos utilizados en el experimento.

2) Medicación:

A.- Pre-operatoria: Anestésica: se ha utilizado sulfato de Atropina, Ketamina y Xilacina, y Diazepam ocasional, por vía intramuscular.

B.- Operatoria: anestésica (Ketamina y Xilacina; a veces, Diazepam)

suero salino fisiológico.

heparina sódica al 5% en vena femoral (250 a 500 U: 0,05 a 1 ml).

C.- Post-operatoria: antibiótico: amoxicilina trihidrato (250 miligramos intramuscular [1 ml / 5 kgr peso] cada 24 horas), durante 3 días.

Tiopental sódico, barbitúrico de acción hipnótica, por vía intravenosa o intracardiaca, para el sacrificio.

3) Guantes y paños quirúrgicos (estériles y no estériles).

4) Material necesario para desinfección y curas: povidona yodada, gasas, compresas y esparadrapo.

5) Instrumental quirúrgico:

A.- Instrumental básico de cirugía: rasuradora (Oster Golden A5, modelo 5-55 H); bisturí (mango número 4, hoja 23 y mango número 3, hoja 11); tijeras de disección (Metzenbaum) y puntiagudas curvas finas; pinzas de disección dentadas (Gillies) y no dentadas (McIndoe y Adson); separadores (Farabeuf y Volkmann); pinzas hemostáticas; mosquitos (rectos y curvos); portas (delicado y fuerte); pinza de Adson-Brown y tijera para hilos (**Fig.1 y 2**).

B.- Instrumental de microcirugía: pinzas de relojero (Stainless y Druco); tijeras de disección (Jakobi 50 y Stainless); pinzas (Stainless); portas (Druco y Drumon), y tijera para hilos (Druco).

6) Materiales de sutura no reabsorbible:

A.- Arteria y Vena Femoral: monofilamento nylon, calibre 7/0 y 8/0; seda trenzada, calibre 6/0 y 7/0.

B.- Venas superficiales: seda trenzada, calibre 4/0.

C.- Músculo y Fascia Muscular: seda trenzada, calibre 3/0.

D.- Piel: seda trenzada, calibre 2/0.

7) Catéteres de perfusión:

A.- Arterial: Vasocán 22 (FEP TEFLON).

B.- Venoso: Vasocán 22 (FEP TEFLON) y llave de tres vías (UNO PLAST).

8) Bomba de perfusión: PERFUSOR SECURA, con una capacidad de perfusión de 1 hasta 100 mililitros por hora (Fig.3).

9) Medios de magnificación: Microscopio operatorio: CARL ZEISS OPMI 3, de 10,67 aumentos (Fig.2 y 3).

10) Luz fría: RAYPA FIBER OPTIC ILLUMINATOR F-150 (aumento de un 100% la potencia del haz de luz frío halogenado) (Fig.3).

11) Termómetros: ICO-MEDICAL y PENN PLAX thermometer.

12) Monitor de transmisión neuromuscular: TOF-GUARD INMT (Fig.4).

13) Máquina de hielo picado: SCOTSMAN AF -10°C (Fig.5).

14) Tubos de hematología: VENOJECT con EDTA K3, de 10 mililitros.

15) Tubos para análisis serológico: VENOJECT con Gel Barrier Silicona Coated, de 10 mililitros.

16) Centrífuga para tubos de análisis de la sangre: HERAEUS LABOFUGE 200 y MSE-MISTRAL 3000 (3 000 rpm durante 12 minutos).

17) Hematología: TECHNICON 435.

18) Gasometría: pH/BLOOD GAS ANALYZER 1306 (graduado a 37°C y Hb fijada en 14,5 gr%).

19) Tubos de ensayo de plástico: con capacidad de 3 mililitros.

20) Pipetas Pasteur de plástico: capacidad de 3 mililitros.

21) Homogenizador cónico (2 centímetros cúbicos de capacidad).

22) Centrífuga para tubos de análisis de los fosfatos musculares: SIGMA 3K 30 (15 000 rpm durante 10 y 12 minutos, a 4°C), con un rotor Sigma N°12157 (16 000 rpm) y tubos de plástico de 10 mililitros.

- 23) Medidor de pH:** CORNING 220 (graduado a 22°C, pH 7 y 79 mV).
- 24) Máquina de liofilización:** VIRTIS 10-324, con temperaturas que oscilan entre +25 a -80°C (liofilizando a -70°C).
- 25) Congelador:** HERAEUS Sepatech (-80°C) y NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC U 57085 (-85°C) (Fig.7).
- 26) Máquina de vacío:** MILLIGER, con potencia hasta 650 milímetros de mercurio (realizando el vacío a 550 mmHg) (Fig.8).
- 27) Campana de desecación por vacío:** SIMAX CSN, de 150 mm de diámetro interior.
- 28) Medidor de HPLC:** Equipo de cromatografía WATERS, compuesto por una bomba Waters 600 E, un inyector automático Waters 717-Plus, un detector de absorbancia Waters Lambda-Max 481 y un equipo de Soft-Ward Millenium 2010 versión 2.10 (Fig.11). Utiliza columnas para medición NOVAPAK C-18, de 15 centímetros de longitud y 0,39 centímetros de diámetro interior para partículas de 4 micrometros.
- 29) Medidor de RNM:** BRUKER 250 AC (250 MHZ de potencia), con una sonda QNP de 5 milímetros para P-31, y tubos de RNM de 5 milímetros de diámetro con 0,5 a 1 mililitro de capacidad (Fig.9 y 10).
- 30) Análisis Histológico:**
- A) Histoquímica: necesitando Tissue-Tek, metilbutano y congelación a -28°C para conservación y corte de las piezas (microtomo-congelador MICROM -30°C). Tinción con nitro blue tetrazolium y adenosín 5' triphosphate (disodium salt), para la técnica de la adenosín trifosfatasa (ATP-asa) a pH 9,4, nicotinamida deshidrogenasa (NADH) y succinil deshidrogenasa (SDH).
- B) Microscopía Óptica: igual, y tinción con hematoxilina eosina, Masson y Oil-Red. Se utiliza un microscopio OLYMPUS VANOX-T AH-2.
- C) Microscopía Electrónica: se introduce la muestra en glutaraldehido y se transporta en tubos MICRONIC 24. Posterior tinción con azul de toluidina y, al final, contrastado con sales de plomo. Para el corte de las muestras se utilizan un microtomo PYRAMITOME, cortes de 1 micra, y un ultramicrotomo ULTRACUT-E, cortes de 600 Amnstrong. El microscopio electrónico es un ZEISS 902 de 400 000 aumentos.

- 31) **Báscula para pesar conejos:** MOBBA, pesa hasta 5 Kilogramos.
- 32) **Báscula para pesar potasa:** LETICA 2066 (Digital Skale).
- 33) **Báscula para pesar muestras musculares:** STANTON DO-3, pesa hasta 200 gramos.
- 34) **Ácido Perclórico al 8,4% 1M** (Densidad 1,60, 66% en un litro y Peso Molecular 100,47).
- 35) **Potasa 1N** (Peso Molecular 56,11 y 85,5% en un litro).
- 36) **Destiladora:** MILLIPORE-Q Plus 185, para obtener agua ultrapura o bi-destilada (18,2 MΩ cm. de resistencia) (Fig.5).
- 37) **Placas KODAK 4489 para microscopía electrónica.**
- 38) **Carrete KODAK 100-ASA, luz normal, para microscopía óptica.**

ESQUEMA GENERAL DEL EXPERIMENTO

Para un mejor entendimiento de la metodología seguida y de las pruebas realizadas, se ha preparado una hoja general, a modo de índice, en el que se especifican éstas.

1.- CONEJO:

- A) PESO** (En kgr).
- B) SEXO** (Macho).
- C) TEMPERATURA ANAL** (En °C).
- D) EXTREMIDAD TRASERA UTILIZADA** (Derecha).
- E) DIAMETRO DE LA EXTREMIDAD** (En cm): Muslo y metatarso.
 - a.-** Inicial.
 - b.-** Finalizado el experimento (isquemia + reperfusión).
 - c.-** A las 24 y 48 horas de la isquemia.
 - d.-** A la semana de la isquemia.

2.- ANESTESIA:

- A) INDUCCION** (ketamina, xilacina, sulfato de atropina y suero fisiológico).
- B) MANTENIMIENTO** (ketamina y xilacina. A veces, se añade diazepam y suero fisiológico).

3.- CIRUGÍA:

- A) Rasurado y desinfección de la piel .**
- B) Incisión de la piel inguinal y disección de la grasa subcutánea.**
- C) Abordaje de la vena (canulación) y de la arteria femoral (clampage).** Comienza el tiempo de isquemia (3, 4 y 5 horas).
- D) Incisión de la piel y apertura de la fascia del músculo gastrocnemio.**

4.- PERFUSIÓN (Suero fisiológico a 20°, 10° y 4°C).

5.- EXTRACCIÓN DE SANGRE:

- A) Medición del pH, hematología y serología:**
 - a.-** Basal.

- b.- Durante los tiempos de isquemia.
- c.- A los 30 min de revascularizar.
- d.- A la semana de la isquemia.

6.- MUESTRAS DE MÚSCULO GASTROCNEMIO MEDIAL DERECHO.

A) Estudio de Nucleótidos con HPLC y RNM:

- a.- Al finalizar el tiempo de isquemia.
- b.- A la semana de la isquemia.

B) Estudio histoquímico:

- a.- A la semana de la isquemia.

7.- MUESTRAS DE NERVIO FEMORAL DERECHO (A la semana de la isquemia).

8.- FIN DE LA ISQUEMIA:

- A) Desclampage arterial y sutura de la arteria.
- B) Extracción del catéter venoso y sutura de la vena (30 min después).
- C) Sutura de la fascia muscular y de la piel (muslo e ingle).

9.- FUNCIÓN NEURO-MUSCULAR:

- A) Basal.
- B) Durante los periodos de isquemia.
- C) A los 30 min de revascularizar.
- D) A la semana de la isquemia.

10.- POST-OPERATORIO:

- A) Amoxicilina im durante 3 días, 250 mgr/día.
- B) Drenaje de la incisión inguinal durante 24 horas.

11.- NECROPSIA (A la semana de la isquemia).

12.- INCIDENCIAS:

- A) Intraoperatorias.
- B) Post-operatorias.
- C) En la necropsia.

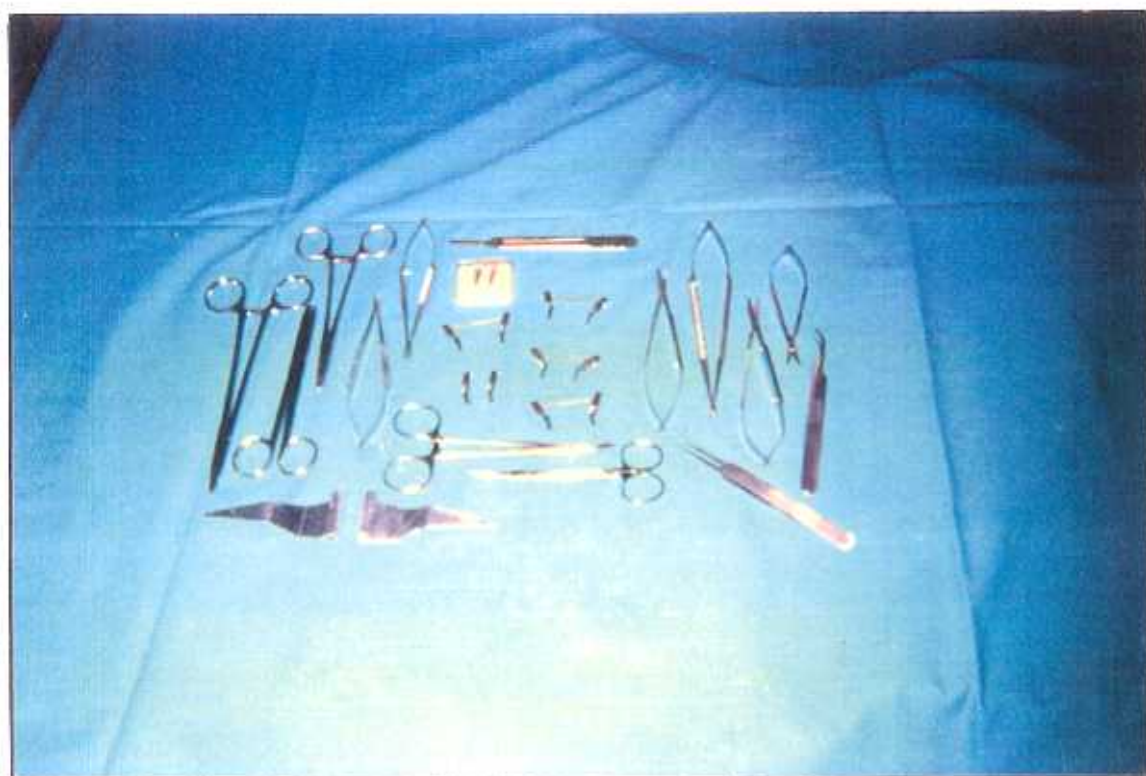


Fig.- 1. Instrumental quirúrgico.



Fig.- 2. Quirófano.



Fig.- 3. Quirófano: medios técnicos durante el experimento.

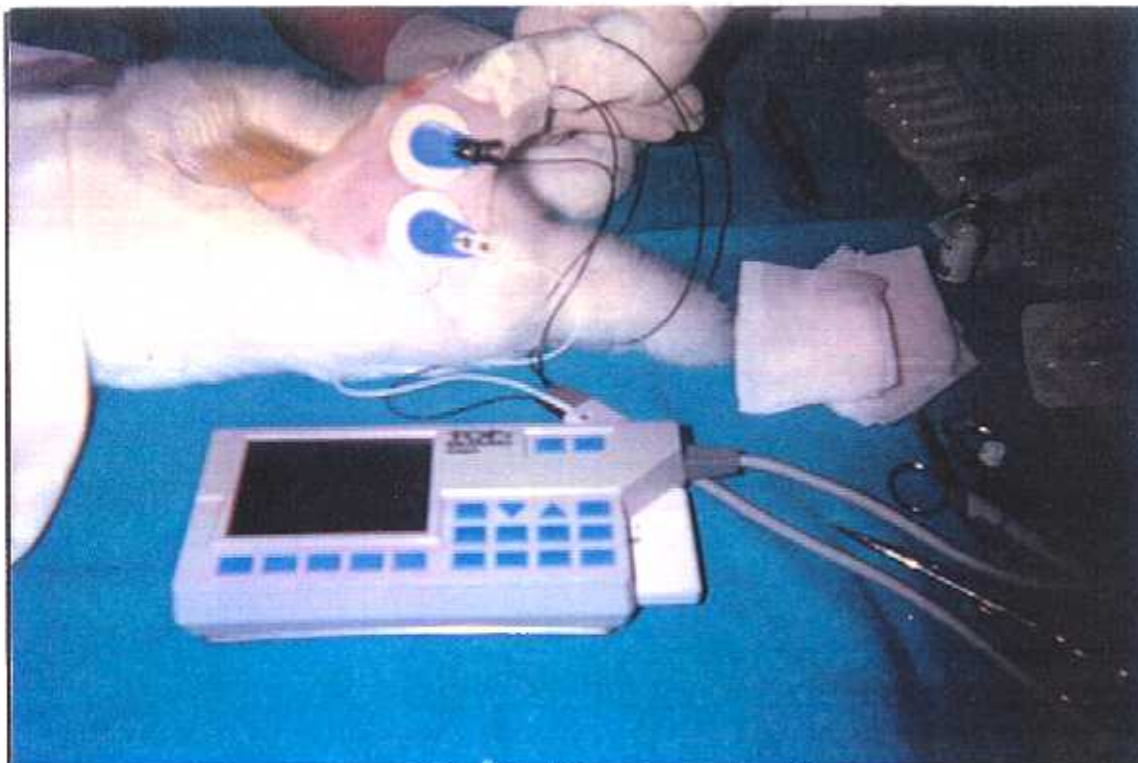


Fig.- 4. Tof-Guard y su colocación.



Fig.- 5. Máquina de hielo y de agua bidestilada.



Fig.- 6. Animalario: sala y jaulas de conejos.



Fig.- 7 Congelador



Fig.- 8 Máquina de vacío Milliger



Fig.-9. R.N.M: Bruker 250 AC.

Fig.- 10. Soft-ward de la R.N.M





Fig.- 11. Equipo de H.P.L.C: cromatógrafo y detector de absorbancia Waters y equipo de soft-ward.

2.2. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Se han utilizado 34 Conejos Neozelandeses machos, de 3 a 4,5 kilogramos de peso, para un total de 27 extremidades posteriores derechas estudiadas.

El conejo (*Oryctolagus cuniculus*) de raza Nueva Zelanda blanco, es un animal muy utilizado en experimentación animal. Como indica el nombre, su pelaje es blanco. Es muy fértil y prolífico, con temperamento algo nervioso y de gran tamaño.

Los animales han sido alojados en las instalaciones de la Unidad de Investigación Clínico-Experimental del Hospital Clínico San Carlos (Madrid), en una habitación para conejos con 18 jaulas individuales (6 filas de jaulas). Están construidas de un material inalterable por el animal y de sustancias no tóxicas (acero inoxidable), de limpieza y desinfección sencilla y en ellas se pueden aplicar con facilidad las tolvas de alimentación y el sistema de bebida.

El animalario se mantiene a una temperatura que oscila entre 18° y 22°C, con una humedad relativa del 40% al 60%, con aire acondicionado exterior climatizado y filtrado, detector de incendios, ruidos de poca intensidad y ciclos de luz-oscuridad de 12 y 12 horas, con un sistema de electricidad normal y otro especial (Fig.6).

La alimentación de los conejos se ha realizado con pienso compuesto en forma de gránulos (5 gr / 100 gr de peso / día) y el agua necesaria (6 ml / 100 gr de peso / día).

La alimentación de los animales es uno de los factores importantes a considerar en experimentación animal, por varios motivos:

- Condiciona el estado nutricional de los animales.
- Una alimentación incompleta puede provocar la aparición de enfermedades en los animales.
- Una alimentación que contenga determinados fármacos o productos puede alterar los resultados de la investigación.

El manejo del conejo, al ser bastante dócil, ha sido sencillo. La sujeción se realiza a nivel de su cuerpo, manteniéndolo entre nuestro cuerpo y el brazo, a la vez que se le inmovilizan sus patas delanteras con la mano. No es recomendable cogerle por las orejas, para evitar actos de agresividad, por el dolor o por miedo. Si sólo se puede utilizar una mano hay que sujetarlo por la piel del dorso (222).

2.3. TÉCNICA QUIRÚRGICA

A.- PROBLEMAS QUIRÚRGICOS BÁSICOS

Convencidos de que el reimplante es uno de los medios de tratamiento más útiles en los casos de amputación, realizamos el programa experimental de la **evaluación biológica del síndrome de revascularización**, con el fin de conseguirlo. Los problemas fundamentales que en un principio se tuvieron que resolver fueron:

- a) Organización de un quirófano con los medios adecuados (macro y microcirugía).
- b) Estudio de las distintas técnicas anestésicas aplicables.
- c) Estudio anatómico de la extremidad posterior del conejo.
- d) Obtención de un método óptimo de enfriamiento de los tejidos que disminuyera el daño metabólico del músculo esquelético.
- e) Estudio de las técnicas microquirúrgicas más adecuadas para realizar las anastomosis vasculares y nerviosas.

La técnica quirúrgica empleada es la utilizada para la amputación de una extremidad posterior (animales) o inferior (humanos) a nivel inguinal, modificando el método de Kihira (111) (**Fig.12 y 13**).

La duración aproximada de la intervención es de 60 minutos.

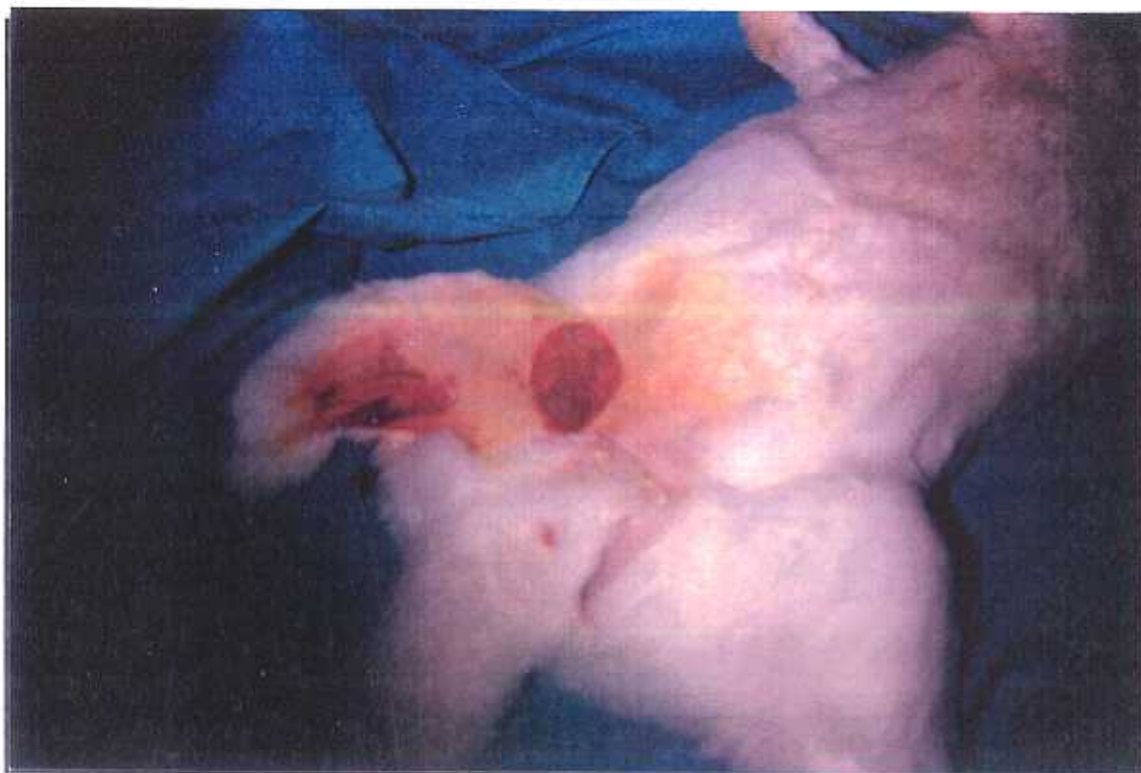


Fig.- 12. Conejo New-Zeland: incisiones.



Fig.- 13, Conejo New-Zeland: sutura de las incisiones.

B.- ANESTESIA

La Anestesia General es un estado reversible de depresión del S.N.C., caracterizado por:

- Anestesia: supresión de la percepción de sensaciones, en particular las dolorosas.
- Pérdida de conciencia: que la diferencia de la anestesia local.
- Ausencia de actividad refleja: vagal, etc.
- Relajación muscular y ausencia de motilidad voluntaria.

Estas condiciones son las adecuadas para realizar intervenciones quirúrgicas mayores, por lo que se denomina también Anestesia Quirúrgica (226,227,228).

Los conejos han sido anestesiados con una solución compuesta por un mililitro de sulfato de Atropina (1 mgr), dos mililitros de Ketamina (100 mgr) y dos mililitros de Xilacina (40 mgr) en una misma jeringa de 10 mililitros, con 5 mililitros de suero fisiológico para diluirlo, administrándose un mililitro de solución por kilo de peso por vía intramuscular.

La Ketamina (Ketalar®) viene en viales de 10 mililitros y 50 miligramos por mililitro. Es un hipnótico disociativo de acción rápida, con potente acción analgésica. Produce sus efectos conservando algunos reflejos y la respiración espontánea.

La Xilacina (Rompún®) al 2% está en ampollas de 10 mililitros, con 20 miligramos por mililitro. Tiene acción tranquilizante, analgésica, anestésica y relajante muscular.

El sulfato de Atropina (Atropina®) está en ampollas de 1 mililitro, con un miligramo por mililitro. Alcaloide natural liposoluble de acción simpaticolítica (antagoniza la acción de la acetil-colina). Se utiliza para disminuir las secreciones de las mucosas y para prevenir el laringoespasmo y el broncoespasmo (222,226,227).

Para el mantenimiento de la anestesia se emplea la misma mezcla, en un principio; luego, sólo ketamina y xilacina, inyectándose uno a dos centímetros cúbicos cada 30 a 60 minutos.

En ocasiones, cuando está muy intranquilo el conejo y con despertares frecuentes, se prepara una mezcla de Diazepam 10 miligramos (2 cc), 100 miligramos de Ketamina (2 cc) y 40 miligramos de Xilacina (2 cc), diluyéndolo con 5 cc de suero fisiológico.

El Diazepam (Valium®) está en viales de 2 mililitros, con 5 miligramos por mililitro. Tiene acción

tranquilizante y relajante muscular (222,227).

El Tiopental Sódico (Pentobarbital sódico) por su potente acción sedante y anticonvulsivante (222,228), con periodo de acción breve, sólo se utiliza para el sacrificio del animal, en un émbolo de 5 a 10 mililitros por vía intravenosa o intracardiaco.

La vía intravenosa en el conejo es prácticamente instantánea pero tiene el inconveniente de presentar, con mucha frecuencia, paradas cardio-respiratorias irreversibles, al ser difícil aplicar maniobras de resucitación a esta especie animal. La intubación es muy dificultosa, lo mismo que la traqueotomía, y además esta última puede interferir el modelo experimental. Hay que utilizar el pentobarbital sódico muy diluido puesto que su margen de seguridad es muy reducido y las dosis se acumulan. Por ello, no lo utilizamos para la anestesia (222).

C.- INTERVENCIÓN

1.- Preparación de la extremidad posterior

a.- Rasurado inicial de la cara interna de la extremidad posterior derecha (desde ingle hasta el tarso) y el cuadrante inferior derecho del abdomen, limpieza con solución antiséptica y povidona yodada, incisión lineal de la piel de la extremidad, de cuatro a cinco centímetros, en el tercio superior del muslo y paralela al pliegue inguinal, unos dos a tres centímetros por debajo. Disección roma, con gasa, de la grasa subcutánea.

b.- Disección del sistema venoso superficial, ligadura con seda 4/0 y sección del mismo.

c.- Disección de la arteria y la vena femoral común, desde el ligamento inguinal hasta cinco centímetros por debajo, respetando el nervio femoral que va paralelo a la cara antero-externa de la arteria. La vena se canula en primer lugar y a un centímetro por debajo del catéter arterial (permite mejor colocación del arterial y mejor perfusión; además, evitamos la perforación de la pared venosa al no tener que inclinar demasiado la guía metálica); se dan puntos de seda 6/0 en los laterales de la vena, al igual que en la arteria (para control posterior de los vasos), y se secciona con bisturí, entre ellos, la cara anterior del vaso, sin clampar. Se canula, de inmediato, con un catéter Vasocán 22 y una llave de triple paso Uno Plast, para la extracción de muestras de sangre (la primera extracción permite comprobar la permeabilidad de la vena). A continuación, clampage de la arteria femoral, lo más próximo al ligamento inguinal (abarcando los vasos principales de la extremidad) y sección distal (a 1 cm) con bisturí de la cara anterior de la misma, canulándola con otro catéter Vasocán 22 y se perfunde a su través con suero fisiológico. Se fijan los catéteres con seda 3/0. Desde este momento, se cronometran los tiempos de isquemia.

Los catéteres Vasocán 22 (Fep-Teflón) son de 0,8 milímetros de diámetro y 25 milímetros de largo, con capacidad para 35 mililitros por minuto.

El tiempo tardado hasta canular ambos vasos varía entre 40 y 80 minutos.

d.- Tras el rasurado y desinfección se procede a la apertura de la piel con una incisión paralela al músculo gastrocnemio medial (disección vertical), de tres o cuatro centímetros. Disección roma del tejido subcutáneo, apertura de la fascia muscular, igual forma y longitud, abordando

el músculo.

2.- Perfusión y Tiempo de Isquemia

La administración de las soluciones se realiza mediante una bomba de perfusión, Perfusor Secura, y una jeringa de 50 mililitros, a una velocidad de 90 mililitros por hora en isquemias de 3 horas (270 ml); 70 mililitros por hora en isquemias de 4 horas (280 ml), y 60 mililitros por hora en isquemias de 5 horas (300 ml), para una cantidad de líquido a perfundir similar.

Con este procedimiento la extremidad permaneció en isquemia durante tres, cuatro y cinco horas, perfundida con soluciones a temperaturas de 20°, 10° (hipotermia intermedia) y 4° +/- 1°C.

La técnica de la hipotermia intermedia se realiza perfundiendo la extremidad, primero, con suero fisiológico a 4°C durante 60 a 90 minutos; a continuación, se perfunde con suero a 10°C el resto del tiempo de isquemia (se consigue así un enfriamiento rápido de la extremidad con el suero frío-helado y, luego, mantenimiento con suero frío-no helado). Para conseguir un enfriamiento homogéneo en los tres grupos, en los tiempos de isquemia de 3 horas se perfundió suero a 4°C durante 60 min; en isquemias de 4 horas se perfundió el mismo suero durante 75 min; en isquemias de 5 horas la perfusión de suero a 4°C se realizó durante 90 min.

3.- Revascularización de la extremidad

a.- Anastomosis vasculares. Las extremidades de los vasos que deben suturarse o anastomosarse se liberan con meticulosidad del exceso de adventicia. Primero, lo realizamos en la arteria, suturándola con nylon 7/0 u 8/0 o seda 6/0, con puntos sueltos o continuos, con aguja atraumática. Se prefiere la sutura continua por su mayor rapidez y mejor hemostasia, aplicándose en la cara anterior de la arteria a intervalos de 1 a 2 milímetros y a una distancia similar desde los bordes, evertiéndose los mismos. Realizamos suturas de sostén, seda 6/0, mediante puntos de colchonero horizontales de eversión, y posterior sutura continua (método de Carrell modificado). Desclampage y se restablece la circulación en la extremidad.

Extirpación de la misma manera de la adventicia de los cabos proximal y distal de la vena, sutura con seda 6/0 o con nylon 7/0 u 8/0, con puntos sueltos. Los puntos sueltos permiten una mejor dilatación de estas estructuras. Si la intervención se prolonga por alguna dificultad, se abrevia utilizando la sutura

continúa.

Se utilizó un microscopio quirúrgico Carl-Zeiss OPMI 3, de 10,67 aumentos, para una mejor visualización.

El tiempo promedio empleado en realizar las anastomosis arterial y venosa fué de 3 a 10 minutos.

Uno de los problemas que se presentan al realizar las anastomosis vasculares es la falta de congruencia en el calibre de los cabos a suturar, tras una sección completa, lo que dará origen a alteraciones en los flujos vaculares. Para evitarlo, por si se seccionaba por casualidad algún vaso en todo su diámetro, se procedió a marcar con puntos los dos laterales de la pared anterior, realizando la sección de los vasos entre ambos puntos. En la posterior reparación, la perfecta orientación de estos puntos garantizó la correcta unión vascular.

b.- Sutura de la fascia y del músculo gastrocnemio. Se realiza de forma continua con seda trenzada calibre 3/0, después de haber tomado las biopsias oportunas.

c.- Sutura de la incisión de la piel. Con puntos sueltos de seda trenzada del calibre 2/0.

Se ha elegido un material de sutura poco traumatizante, que se tolera bien por los tejidos y se maneja con facilidad al emplear el instrumental quirúrgico adecuado, utilizando una técnica lo más atraumática posible para actuar sobre estas estructuras.

Con un buen conocimiento de la anatomía del nivel de sección es sencillo abordar las distintas estructuras y lograr una aposición correcta de las mismas.

Se dejan colocados drenajes de tejadillo durante 24 horas, ya que el problema principal post-quirúrgico es el edema, causado por la dificultad del retorno venoso y linfático, producido por la sección de estas estructuras. Aunque se repara la vena femoral común, a veces no basta para drenar todo el flujo arterial.

Para evitar infecciones (205), al finalizar la intervención se administran al conejo 250 mgr de amoxicilina, por vía intramuscular, y se repite cada 24 horas durante 3 días.

2.4. LABORATORIO

Desde el punto de vista bioquímico, se ha pensado que sería de gran interés el poder obtener una batería de pruebas útiles para observar la forma de evolución del reimplante de un miembro, de manera global, y poder predecir, de forma precoz, aquellas alteraciones que pudieran estar en relación con un pronóstico evolutivo peor.

A.- Medida de los Nucleótidos de Adenina

1.- La adenosina trifosfato (ATP), la adenosina difosfato (ADP) y la adenosina monofosfato (AMP), se han cuantificado mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de extractos de muestras del músculo gastrocnemio, modificando el método de Kihira (111) y Sugino (210).

2.- La otra forma de cuantificar los fosfatos de alta energía (ATP y ADP), así como la PCr y el Pi ha sido mediante la espectroscopia del P-31 con resonancia nuclear magnética (RNM), a partir de extractos celulares del músculo gastrocnemio.

Se obtienen muestras musculares tras la anestesia, en una serie de conejos, como control; en los demás, al final de cada periodo de isquemia y a los siete días de la revascularización.

Tras los resultados obtenidos en diferentes investigaciones sobre el estado metabólico del músculo aislado y perfundido, los indicadores más convenientes para valorar la integridad del tejido son los niveles de ATP, PCr y Pi, siendo los valores de ADP y AMP menos eficaces (139).

B.- Serología

En todos los grupos la sangre venosa se tomó de la vena femoral, a partir de la llave de triple paso Uno Plast, tras la anestesia y antes de la perfusión (muestra basal), al finalizar los tiempos de isquemia y a los treinta minutos de la revascularización. A la semana, antes del sacrificio, otra toma.

La muestra de sangre obtenida se introduce en 2 tubos para análisis: uno, es un Venoject con EDTA 3K, se introducen 5 cc de sangre por vacío y servirá para medir la fórmula hemática; el otro, es un Venoject revestido con gel de silicona, se introducen de la misma manera 5 cc de sangre y nos permitirá medir la serología.

Para evitar la coagulación de la vena, se instila con 0,5 a 1 mililitro de heparina (250 a 500 Unidades).

Con la muestra basal se realiza una medición de los valores sanguíneos normales (hematología), así como un análisis de la creatín fosfokinasa (CPK), la transaminasa glutámico oxalacético (GOT-AST), la láctico deshidrogenasa (LDH), potasio (K^+), calcio (Ca^{2+}), urea, creatinina, glucosa, proteínas y el pH. En las tomas posteriores se evaluará sólo la serología. A la semana, igual que la toma basal (**Tabla II a XXI; Fig.14 a 89**).

Las mediciones se realizan:

- Los Hematíes por millón (10^6).
- La Hemoglobina en gramos por cien (gr%).
- El Hematocrito en tanto por cien (%).
- Los Leucocitos por mil (10^3).
- Las Plaquetas por mil (10^3).
- Las Proteínas en gramos por cien (gr%).
- El pH se mide en un pHmetro regulado a $37^\circ C$ y hemoglobina fijada en 14,5 gramos por cien (**Tabla II a IV; Fig.14 a 24**).
- La pCO_2 y la pO_2 en milímetros de mercurio (mmHg).
- El HCO_3 y el BEb en milimoles por litro (mmol/L).
- La saturación de oxígeno en tanto por cien (%).
- La Glucosa, Urea, Creatinina y Calcio en miligramos por cien (mgr%).
- El Potasio en miliequivalentes por litro (mEq/L).
- La GOT-AST, LDH y CPK en unidades internacionales por litro (UI/L) (**Tabla V a XXI; Fig.25 a 89**).

Para apreciar si existe edema en la extremidad se mide su diámetro, en centímetros, tras la anestesia (basal), al finalizar el experimento, a las 24 h y 48 h y a la semana, tras lo cual, se sacrifica al animal.

C.- Músculo

Se estudia mediante biopsia del músculo gastrocnemio derecho, vientre medial, que nos permite hacer estudios:

- 1.- analíticos: examen de los fosfatos de alta energía.
- 2.- histológicos: con microscopio óptico y electrónico e histoquímica.

Todas estas determinaciones nos indican la funcionalidad del músculo, tanto perfundido como en su posterior reimplante, siendo capaces de predecir el grado de reversibilidad de la lesión isquémica y la regeneración muscular. La reversibilidad en la pérdida de la función contráctil va a depender, con mucha probabilidad, de la severidad y duración de la isquemia, aunque esta relación permanece en la actualidad sin cuantificar. En cualquier caso, aunque varios fenómenos pueden considerarse los responsables de la lesión estructural y de la alteración persistente de la función muscular, el grado de deplección de los enlaces de alta energía, así como su duración, sería el fenómeno que jugaría un papel mayor. Es de gran importancia averiguar, a través de las alteraciones detectadas en el metabolismo energético, los factores que puedan ser capaces de predecir el grado de reversibilidad de la isquemia.

2.5. ESTUDIO HISTOLÓGICO

En primer lugar describiré la estructura histológica del músculo y proseguiré con las técnicas empleadas para el estudio de los músculos y nervios mediante microscopio óptico, microscopio electrónico e histoquímica.

A.- Músculo

1.- Histología

El músculo está adaptado al acortamiento unidireccional durante la contracción. A causa de esto, la mayoría de las células musculares son alargadas y tienen la forma de huso y la mayor parte del citoplasma está ocupado por las miofibrillas contráctiles. En el músculo cardíaco y esquelético las miofibrillas son estriadas y tienen bandas oscuras que se alternan con bandas claras. La unidad estructural de la miofibrilla es la **sarcómera**, que también es la unidad contráctil.

En las células musculares sólo una pequeña parte del citoplasma -el sarcoplasma- mantiene su característica embrionaria. Se distribuye entre las miofibrillas y es muy abundante alrededor del núcleo (50,64).

El músculo estriado del esqueleto está constituido por **fibras cilíndricas** que tienen entre 10 y 100 micrometros de diámetro y varios milímetros o centímetros de largo, originadas por fusión en el embrión de varias células primordiales, los mioblastos. Toda la fibra está rodeada de una membrana, **sarcolema**, que está polarizada eléctricamente, con un potencial de -0,1 voltio, siendo negativa la superficie interna respecto a la externa. Cuando un impulso nervioso alcanza la placa motora del músculo se despolariza la membrana, produciéndose la contracción de todas las fibras de manera coordinada (50).

En la fibra muscular existen tres componentes citoplasmáticos muy diferenciados. Uno es la maquinaria contráctil de los miofilamentos, que se disponen en paralelo para formar estructuras fibrilares, **las miofibrillas**. El segundo componente es el **retículo sarcoplásmico**, diferenciación especial del sistema de endomembranas, relacionado con la conducción en el interior de la fibra y con la coordinación de la contracción de las diferentes miofibrillas, así como en la relajación muscular. El tercer componente son las **mitocondrias (sarcosomas)**, dependiendo su abundancia de la frecuencia

con la que se contrae el músculo.

Las miofibrillas son estructuras cilíndricas alargadas, de 1 micrometro de diámetro, cuyas estriaciones resultan de la repetición de la unidad fundamental, la sarcómera, limitada por una línea densa, **línea o disco Z**. Esta línea se localiza en el centro de una zona menos densa, la **banda I**. La **banda A** tiene una densidad mayor que la banda I, teniendo en su centro una zona menos densa, que la divide en dos semidiscos oscuros, la **banda o disco H** (disco de Hensen), en cuyo centro se observa la **línea M**.

Existen dos clases de **miofilamentos**: **los gruesos**, formados por miosina, y **los finos**, formados por actina, tropomiosina y las troponinas. Ambos se encuentran en el mismo nivel y en estado de relajación la banda I contiene sólo filamentos finos, la banda H sólo filamentos gruesos y la banda A filamentos finos y gruesos superpuestos. Cada filamento grueso está rodeado de seis filamentos finos y cada filamento fino se halla situado de forma simétrica entre tres filamentos gruesos, en los músculos de los vertebrados (50,64).

2.- Técnica histoquímica

Se obtienen muestras del músculo gastrocnemio medial derecho de 1,5 cm de largo por 1 cm de ancho por 1 cm de grosor (1,5x1x1 cm) y se las introduce en un recipiente transportador, con una gasa humedecida en suero fisiológico como base de apoyo. En la sala de disección del servicio de anatomía patológica se extrae el músculo y se sitúa sobre una superficie dura de color blanco, para orientar sus fibras al realizar el corte. Tras practicarlo, con un bisturí, se coloca una sección muscular de 0,5 cm x 0,5 cm sobre una base de corcho, de 2 cm x 2cm, con las fibras musculares transversales a éste, se cubre con un gel Tissue-Tek y se la introduce en metilbutano. El metilbutano se ha congelado con anterioridad, introduciéndolo en un vaso de vidrio y éste en un recipiente con nitrógeno líquido, se extrae al congelarse y se deja que se descongele (pasa a líquido) el centro (3 a 5 minutos), introduciendo en dicho momento la pieza de músculo invirtiendo el corcho. Al congelarse, presenta un aspecto blanquecino, se lleva a un congelador a -80°C para su conservación y posterior utilización en el estudio histoquímico.

La colocación de las fibras musculares en posición transversal con respecto al corcho se debe a

que así evitamos los artefactos al realizar los cortes en el microtomo (Mikrom).

El congelar el músculo en metilbutano y éste congelarlo en nitrógeno líquido, y no en el nitrógeno líquido de forma directa, se debe a que así evitamos la formación de cristales de agua por congelación dentro de la fibra muscular. El metilbutano congela de manera rápida y por igual, siendo más lento el nitrógeno líquido, no apareciendo artefactos (burbujas) en las preparaciones posteriores.

Otra sección del músculo se introduce en un vaso con formol al 10% tamponado, conservándose en él hasta su utilización para el estudio con microscopio óptico. Se teñirá con hematoxilina y eosina, tricrómico de Masson y Oil-Red-O.

La última toma de muestra, con menos cantidad de músculo, se sumerge en una solución de glutaraldehído y servirá para el estudio con microscopio electrónico.

A.- Microscopio Óptico

a) Tinción.

Se han utilizado las técnicas de tinción de hematoxilina-eosina, para apreciar la forma y tamaño celular, tricrómico de Masson, visualizando los elementos estructurales, y el Oil-Red-O, para observar la grasa.

Se estudian mediante un microscopio Olympus Vanox-T AH-2.

Para seguir un modelo, las lesiones musculares se han dividido en grados leve y grave (**Fig.90 a 105**).

1.- Leve:

- a.-** Fibras musculares íntegras.
- b.-** Conservación de estriaciones transversales.
- c.-** Edema.

2.- Grave:

- a.-** Fragmentación de las fibras.
- b.-** Pérdida de la estriación transversal.
- c.-** Inflamación.
- d.-** Edema intenso.
- e.-** Depósitos cálcicos.

b) Histoquímica.

Extracción de la pieza conservada en congelador, sección con el microtomo (Mikrom) y tinción con nitro blue tetrazolium y adenosín 5'triphosphate (disodium salt). Con ello, apreciamos las enzimas ATP-asa, a pH 9,4, la NADH y la SDH.

Las lesiones musculares se dividirán en leves y graves, atendiendo a la presencia o no de dichas enzimas (**Fig.90 a 105**).

B.- Microscopio Electrónico

Se transporta la muestra muscular en un tubo Micronic 24 con una solución de glutaraldehído, para fijar el músculo, diluido al 4% en un buffer de fosfato. Se extrae el músculo y se le introduce en el buffer fosfato, pH 7,5, durante 24 horas. Lo máximo que puede estar en dicha solución son 7 días. A continuación, una nueva fijación con Tetróxido de Osmio (OsO_4), que es muy tóxico y hay que utilizarlo con guantes y mascarilla. Siempre se realizan 2 fijaciones.

Previo a la fijación con tetróxido de osmio, se efectúa el tallado de la pieza, mediante cuchillas, obteniendo unas muestras de 1 mm de largo por 1 mm de ancho por 2 mm de grosor (1x1x2 mm).

El último paso es el contrastado (tinción de contraste de las rejillas), para poder ser estudiadas con el microscopio electrónico. La secuencia es:

Cortes ultrafinos (600 a 1000 Amnstrong) con un Ultracut-E, longitudinales y transversales, y se ponen 8 cortes en una rejilla de plomo.

Tinción con: Acetato de Uranilo al 2% en agua bidestilada y Citrato de Plomo Reynolds.

Se estudian mediante un microscopio electrónico Zeiss 902 de 400 000 aumentos.

Se realizan, también, estudios de los vasos-capilares.

Las alteraciones observadas con microscopía electrónica se han dividido en grados leve y grave, según se estudien los vasos o las fibras musculares (**Fig.106 a 123**).

VASOS-CAPILARES (diámetro exterior, de membrana basal a membrana basal, de 10 micras o menos).

A) Lesión endotelial :

1.- Leve:

a.- Hinchazón mitocondrial.

b.- Hinchazón del retículo endoplásmico.

- c.- Dilatación de la cisterna perinuclear.
- d.- Condensación de cromatina en la periferia del núcleo.
- e.- Pared capilar más delgada e intacta.

2.- Grave:

- a.- Roturas intercelulares.
- b.- Roturas endoteliales (destrucción parcial o agrietamiento celular).
- c.- Capilares con una profunda indentación de la pared, que estrecha u oblitera la luz.

B) Lesión Intravascular:

- a.- Hematíes con hemolisis y/o vesículas.
- b.- Leucocitosis en la luz capilar.
- c.- Coágulos intravasculares, con bandas de fibrina.
- d.- Cuerpos esféricos libres.

C) Lesión del Espacio Intersticial:

- a.- Extravasación de hematíes.
- b.- Presencia de vesículas.

FIBRA MUSCULAR

A) Mitocondria:

1.-Leve:

- a.- Hinchazón mitocondrial, conservando las crestas del perfil interior.
- b.- Ausencia de inclusiones intramitocondriales.

2.- Grave:

- a.- Mitocondrias muy hinchadas.
- b.- Pérdida casi/o completa de las crestas del perfil interior.
- c.- Inclusiones intramitocondriales: - Densidades floculares.
- Placas trilaminares.

B) Miofibrilla:

1.- Leve:

- a.- Pérdida parcial de la arquitectura estriada transversal, identificándose las bandas y las líneas.

- b.- Hinchazón del retículo endoplásmico .
- c.- Disminución de los gránulos de glucógeno .

2.- Grave:

- a.- Hinchazón y/o rotura celular.
- b.- Pérdida difusa de la arquitectura estriada transversal : disolución de las líneas Z.
no distinción de la banda A-I.
- c.- Hinchazón y rotura del retículo endoplásmico.
- d.- Pérdida de los gránulos de glucógeno.
- e.- Aumento de las gotitas de lípidos.
- f.- Fagocitosis leucocitaria de elementos miofibrilares.

B.- Nervio

Se practica un estudio pre y postmortem del nervio safeno-femoral con microscopio electrónico.

Las biopsias se realizan: tras la anestesia del conejo (basal) en 2 de ellos y a la semana de la intervención en todos los demás, para conocer los efectos de la isquemia, momento en el que se sacrifica (extraemos 8 nervios en total).

Se secciona el nervio completo, en todo su recorrido dentro del compartimento anterolateral, y se lleva junto al músculo al servicio de anatomía patológica. El nervio se secciona en 2 partes y se introduce en glutaraldehído, para su estudio con el microscopio electrónico.

El material para su estudio se preparó según la técnica descrita en el punto anterior. Luego, se continúa con la técnica utilizada para el músculo.

Las lesiones las clasificamos en grado leve y grave, examinando fibras mielinizadas y no mielinizadas (Fig.124 a 129).

A) Fibras Mielinizadas:

1.- Leve:

- a.- Degeneración parcial.
- b.- Cambios en la estructura normal multilamelar de la mielina.
- c.- Hinchazón del axón.

2.- Grave:

- a.- Degeneración intensa.
- b.- Pérdida de la estructura multilamelar de la mielina.
- c.- Degeneración completa de los contenidos del axón.

B) Fibras No Mielinizadas:

- a.- Degeneración axonal.
- b.- Balonización.
- c.- Desorganización extensa de las células de Schwann.
- d.- Desestructuración de las organelas exoplásmicas.
- f.- Formación de cuerpos densos.

Para saber el grado de lesión que existe, tanto en el músculo como en el nervio, a cada una de las diferentes alteraciones que presenten se le aplica una puntuación que varía entre 0 (no alteración) y 5 puntos (máxima alteración), haciendo un estudio de 3 a 5 campos. Cuantos más puntos tenga, mayor gravedad de la lesión.

2.6. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN

En este apartado describiré, en primer lugar, los conceptos teóricos de la técnica; en segundo lugar, la realización de la técnica.

A.- Conceptos Teóricos

Un proceso cromatográfico supone la separación de una mezcla de productos en sus componentes individuales y la monitorización de éstos con un detector, para la determinación cuantitativa y/o identificación cualitativa.

En este proceso de separación, un fluido "**Fase Móvil**" circula en íntimo contacto con una "**Fase Estacionaria**" líquida o sólida. Al introducir en nuestro sistema una mezcla de sustancias solubles en fase móvil éstas se separarán como resultado de sus diferentes interacciones físicas y químicas, entre la fase móvil y la estacionaria.

La optimización del proceso cromatográfico implica obtener la separación suficiente entre dos componentes adyacentes lo más rápido posible.

Limitándonos a aquellos casos en los que la Fase Móvil es un líquido, es decir, la "**Cromatografía de Líquidos**", es la naturaleza de la Fase Estacionaria la que determina el mecanismo de distribución del soluto entre las dos fases.

Aunque las técnicas de cromatografía en columna se utilizan con fines preparativos desde hace muchos años, su utilización con fines analíticos es mucho más reciente. El desarrollo de la cromatografía de gases, en la década de los cincuenta, redujo el interés de la cromatografía líquido-líquido hasta la aparición de la **Cromatografía Líquida de Alta Presión o Resolución (HPLC, high performance liquid chromatography)**, que puede competir con la cromatografía de gases en muchas aplicaciones analíticas.

Para una separación eficaz es necesario contar con soportes muy regulares y finamente divididos, con un suministro de fase móvil a la presión necesaria para mantener un flujo constante y adecuado a través de la columna y con un sistema de detección eficaz. Los aparatos utilizados constan de cinco componentes básicos, existiendo modelos más o menos satisfactorios de todos ellos.

B.- Técnica Experimental

Se utiliza la técnica de Kihira (111) y Sugino (210) modificada y diferente a la utilizada por Rubin (179).

Tras anestesiar al conejo, se disecciona el muslo y se extrae una biopsia del vientre medio del músculo gastrocnemio, se pesa con exactitud y se congela de inmediato en nitrógeno líquido. Las muestras basales pesan de 0,5 a 0,65 gr (obtenidas al finalizar el tiempo de isquemia) y las muestras conseguidas a la semana pesan de 1 a 1,15 gr. A continuación, se homogenizan (con un homogenizador de Pother) en 2 centímetros cúbicos de ácido perclórico (PCA) al 8,4% que está a 4°C. Se tritura hasta que aparece una solución lechosa-marrón en la mitad inferior y transparente-blanquecina en la mitad superior del homogenizador. Con la muestra basal se tarda entre 9 y 13 minutos, con la muestra de la semana se tarda entre 12 y 20 minutos. Esta solución se traslada a un tubo de plástico de la centrífuga Sigma 3K 30, refrigerada a 4°C, y se centrifuga a 15 000 revoluciones por minuto durante 12 minutos. Se extrae el tubo de centrífuga y el sobrenadante se introduce en un recipiente de vidrio (la parte sólida queda pegada al tubo de plástico y se desecha) que se ajusta con potasa (KOH) 1N a un pH de 7 a 8 (medido en un pHmetro Corning 220) formándose un precipitado blanco (clorato potásico).

La dosis y porcentaje de PCA era la misma que se utilizaba en otros experimentos (111,210) pero al añadir la KOH 5N se producían bruscos cambios del pH, con dosis mínimas empleadas, por lo que se ha utilizado KOH 1N, tras distintas pruebas, para conseguir cifras de pH que oscilaran entre 7 y 8 de forma más fácil.

La solución conseguida al añadir KOH se introduce en otro tubo de plástico y se lleva a la anterior centrífuga, para un nuevo centrifugado a 15 000 rpm pero sólo 10 minutos. El nuevo sobrenadante se extrae (la potasa, de color blanco, se queda pegada en la pared del tubo de centrífuga) y se distribuye, en proporciones similares, en tubos para HPLC y RNM.

El líquido extraído tras la primera centrifugación varía entre 1,5 y 2 mililitros, necesitando entre 1,3 y 1,95 mililitros de potasa para obtener un pH próximo a 7,5 (oscila entre 7,2 y 7,8).

El sobrenadante que se obtiene para HPLC varía entre 1,5 y 2 centímetros cúbicos (de los 3,5 a 4 mililitros totales), se traslada a un congelador Heraeus o New Brunswick y se congela a -80°C (un mínimo

de 2 horas antes de liofilizar). Se liofiliza a posteriori en una máquina de vacío Milliger y se conserva en una campana de vacío Simax CSN, en nevera a 4°C, hasta su estudio.

El extracto muscular liofilizado se suspende en 1 mililitro de agua desionizada en las columnas Novapak C-18 (15 cm de longitud y 0,4 cm de diámetro); éstas, se sitúan en un carro giratorio de la bomba Waters 600E y se introducen en un espacio interior e inferior para conservar las muestras a 4°C. Desde ahí, el inyector automático Waters 717-Plus establece un flujo de trabajo de 2 mililitros / minuto. Una vez que introduce 2,5 microlitros de solución en el detector de absorbancia Waters Lambda-Max 481 se miden los fosfatos, mediante una longitud de onda de 260 nanómetros (165). Como gradiente de elución en la fase móvil se utiliza una solución tamponada compuesta de: Di hidrógeno fosfato potásico (KH_2PO_4) 10 micromolar, Tetrabutil amonio 2 micromolar y un 13% de Aceto nitrilo, para obtener un pH de 7,5 con el que se realiza la medición (74,75,76).

Para la obtención de un patrón que nos sirva de referencia para las mediciones posteriores, se miden soluciones de 250, 500 y 750 picomoles de AMP, ADP y ATP. En el programa del ordenador, Millenium 2010 versión 2.10, aparecen unos picos, con un área y en un tiempo determinado, con los que traza una recta de calibrado (áreas frente a muestras). Los tiempos de retención en los que aparecen, de menor a mayor tiempo, son los siguientes: **AMP en 1,267 min; ADP en 2,235 min; ATP en 4,500 min.**

La técnica utilizada es la del **Par Iónico** y las mediciones obtenidas se dan en picomoles y en % de área (**Tabla XXII a XXX; Fig.130 a 150**).

2.7. ESPECTROSCOPIA CON RESONANCIA NUCLEAR MAGNÉTICA

El estudio de la biología molecular del músculo es uno de los ejemplos más interesantes de la íntima asociación entre estructura y función, y de la manera en que la energía química se traduce en trabajo mecánico (integración fisiológica y estructural a nivel macromolecular). El acoplamiento entre excitación y contracción está basado en un complejo sistema de conducción intracelular, que lleva el potencial de acción hacia la porción más profunda de la fibra muscular, produciendo la sincronización funcional de las miofibrillas, desempeñando el retículo sarcoplásmico, los iones calcio, el ATP y la ATP-asa activada por el Ca^{2+} un papel principal (50,51).

En este apartado describiré, en primer lugar, el mecanismo físico de la espectroscopia del fósforo-31 y las aplicaciones a la fisiología muscular; en segundo lugar, la técnica utilizada.

A.- Aplicación de la espectroscopia del P-31 con R.N.M.

1.- Bases físicas de la espectroscopia con RNM.

Desde que Hoult et al (99), en 1974, relataran la primera espectroscopia del fósforo con RNM en el músculo de rana, las técnicas de RNM han sido aplicadas al estudio de diferentes sistemas, variando en su complejidad desde bacterias y suspensiones de organismos animales (97), hasta animales (1,55,150) e incluso en humanos (55,214). Y el uso clínico de la RNM como prueba del metabolismo orgánico "in situ" no está lejana (31,139).

Durante toda esta época de crecimiento científico, el músculo estriado ha permanecido como el sujeto de interés más importante. Esta atención se deriva, en parte, del hecho que los metabolitos fosforilados medidos de manera directa por la RNM (ATP, PCr y Pi), están relacionados de manera íntima con la función muscular de convertir la energía química en mecánica.

Las aplicaciones biológicas de la espectroscopia del P-31 con RNM dependen, de forma importante, de las "técnicas de pulso" (24,31,139).

Los fosfatos de alta energía, el helio (He), el hidrógeno (H) y otros compuestos, poseen la propiedad que al colocarlos bajo un potente campo magnético absorben ondas de radio a frecuencias determinadas. Este fenómeno se conoce con el nombre de **resonancia magnética nuclear (RNM)**. Después, los fosfatos liberarán esta energía mediante un proceso llamado de relajación energética. La energía liberada

puede captarse en una antena receptora y con la señal construir una imagen de RNM (67).

Cuando un fosfato entra en resonancia absorbe energía. La frecuencia de esta energía depende del valor del campo magnético que en aquel momento perciba el fósforo. En consecuencia, si queremos obtener una imagen en un plano determinado, basta hacer que todos los núcleos del plano perciban el mismo campo magnético y que éste sea distinto del resto. Esto se consigue mediante los gradientes magnéticos, que producen variaciones lineales del campo magnético a lo largo de una distancia. Durante la generación de la imagen los gradientes magnéticos se activan y desactivan de forma muy rápida (en mseg), constituyendo los pulsos de gradiente (31,67,139).

Las emisiones de radiofrecuencia que hacen entrar en resonancia a los fosfatos son de muy corta duración (mseg) por lo que en RNM se habla de pulsos de radiofrecuencia. Las imágenes por RNM se obtienen por secuencias de pulsos, que consisten en programar de forma adecuada los pulsos de radiofrecuencia con los pulsos de gradiente (18,67).

Siendo más precisos, el espectro se obtiene a partir del F.I.D (Free Induction Decay), que es una señal producida por el golpeteo del voltaje originado en el carrete del espectrómetro, en presencia de un pulso de radiofrecuencia constante (31,139).

El tiempo de resolución de un experimento con RNM no está limitado por la proporción de la acumulación del espectro. Sólo lo está por el tiempo exigido para el registro de una sola FID, unos 50 milisegundos (66,97).

2.- Aplicaciones a la fisiología muscular

La aplicación más inmediata de la espectroscopia del fósforo 31 con RNM es la determinación de los niveles relativos de **Adenosín Trifosfato (ATP)**, **Fosfocreatina (PCr)** y el **Fósforo Inorgánico (Pi)** musculares.

En la práctica, es difícil calibrar las áreas señaladas en términos de concentraciones absolutas de tejido. En cambio, áreas relativas se miden y gradúan de forma corriente mediante consulta de análisis químicos del mismo tejido. Los diferentes picos se han identificado mediante la comparación con soluciones patrón. En músculos estimulados o isquémicos también aparece el pico de la **Glucosa Fosfato** (31,46,47), y algunos músculos muestran picos debidos a los **Fosfodiésteres** (ignorados con anterioridad), que parecen ser específicos de especie y pueden tener alguna relación con la patología muscular (90).

Si las mediciones de estos pocos metabolitos fuera la única utilidad de la espectroscopia del P-31 con RNM, todavía sería una nueva técnica a evaluar. Gracias a esta técnica se pueden medir los cambios de los metabolitos durante una secuencia de contracciones o durante un periodo de ischemia (31,139,203). La gran utilidad de la espectroscopia con RNM es su capacidad única para ser utilizada como sonda del medio ambiente intracelular (139).

B.- Técnica Experimental

El aparato utilizado es un Bruker 250 AC, de 250 megaherzios de potencia, con una sonda QNP para los fosfatos de 5 mililitros y tubos de R.N.M. de 5 milímetros de diámetro interior, con una capacidad de 0,5 a 1 mililitro.

La preparación de las muestras musculares es igual a la descrita para el estudio con HPLC.

Las muestras musculares liofilizadas y con un pH entre 7 y 8, que se han conservado en una campana de vacío a temperaturas de 4°C, se las diluye con 1 mililitro de agua pesada. Se disponen los tubos sobre un carro giratorio y se inyecta la misma cantidad en el Bruker 250 AC. Se mantiene durante 3 horas cada espectro y se realizan 2 500 acumulaciones. Una vez obtenido el espectro, se realiza una transformación matemática del mismo de 6 veces, para una mejor definición. Para su posterior estudio, la figura original se amplía de 3 a 6 centímetros.

En el músculo, los metabolitos energéticos que son detectables mediante RNM, en cantidades insignificantes, incluyen la adenosina trifosfato (ATP), la fosfocreatina (PCr), los compuestos glicolíticos fosforilados intermedios (glucofosfatos: PME y PDE, fosfo mono y di ésteres) y los productos destruidos de baja energía, el fosfato inorgánico (Pi). Los resultados analíticos adoptan la forma de un espectro, en el cual, el área bajo cada pico es proporcional a la cantidad de cada núcleo particular de fósforo-31 en el volumen de tejido que se está examinando.

El espectro generado en cada exploración (que se desplaza por el pH que tiene) se ha trazado con un ordenador, mostrando diferentes registros gráficos. Los valores relativos presentes de PCr, Pi, PME y PDE se han determinado mediante la integración digitalica, por ordenador, del área existente debajo de cada pico respectivo. La medida del ATP se hace mediante el conteo de las áreas bajo los tres picos que lo componen, siendo el área bajo el pico β el más específico, pues en los picos γ y α introducen

señales los picos α y β del adenosín difosfato (ADP) (un procedimiento indirecto para calcular la concentración de ADP es cuando la relación pico β / pico γ del ATP está próxima a la unidad) (31), y el dinucleótido de adenina nicotinamida (DAN).

Los resultados conseguidos se expresan en partes por millón (ppm) de resistencia al campo magnético exterior o en % del área total que ocupan (**Fig.151 a 170**).

2.8. ESTUDIO DE LA CONDUCCIÓN NERVIOSA

A.- Conceptos Teóricos

Existen diversos métodos para controlar la respuesta contráctil muscular. Quizás el método utilizado con mayor frecuencia sea la evaluación clínica por medio de la estimulación de los nervios periféricos (30,85,114). Si bien se trata de un procedimiento sencillo, a este método le falta precisión, porque la interpretación de las respuestas es subjetiva (130,131).

Se puede obtener información exacta realizando mediciones de la fuerza de contracción de cierto músculo (84,115,123). Este procedimiento proporciona información objetiva, pero el equipo necesario es bastante voluminoso y difícil de utilizar a causa de lo complicado de su instalación y su sensibilidad a los movimientos (127,215).

Una buena alternativa a la medición de la fuerza es la medición de la aceleración. Según la segunda ley de Newton: la Fuerza es la Masa multiplicada por la Aceleración ($F = M \times A$); la aceleración de un músculo tiene una correlación lineal con la fuerza ejercida por este músculo. Se ha demostrado que existe una buena correlación entre los resultados de la acelerografía y los de la mecanomiografía (215).

El estudio de la capacidad funcional del músculo se realiza mediante un monitor de transmisión neuromuscular (TOF-GUARD INMT). Las mediciones realizadas por el Tof-Guard están basadas en el principio de la aceleración (215).

Este equipo se compone de:

- A)** dos terminales de estimulación, uno positivo, que se sitúa siempre proximal en la extremidad y otro negativo, que se sitúa a 2 ó 3 centímetros por debajo. Son redondos, 30 milímetros de diámetro, con resorte alcalino o Ni/Cad de 9 V;
- B)** un termistor-sensor térmico (mide entre 16° y 41,5°C);
- C)** un receptor-traductor de la respuesta muscular (traductor de aceleración);
- D)** un microprocesador que controla la potencia empleada (en miliamperios) y nos indica con gráficas y numérico porcentual la respuesta motora.

La potencia de salida oscila entre 0 y 60 mA de corriente continua (constante) y regulable en 5 kohmios, monofásica, con una duración de 200 microsegundos (ancho de pulso). Su cadencia automática

es cada 10 segundos. Para la estimulación utiliza un tren de cuatro (TOF) para una contracción de 1 segundo (215).

La colocación correcta de los electrodos es importante, puesto que ligeros desplazamientos podrán llevar a cambios considerables en los requisitos de la corriente de estimulación. Los electrodos se deben colocar en estrecha relación con el nervio y no con el músculo, para poder obtener la máxima estimulación con la mínima descarga de corriente, separados por 2 a 3 centímetros y siempre el positivo ha de ser proximal en la extremidad. Los impulsos de la estimulación son monofásicos. Un cambio en la conexión de los electrodos puede producir, a veces, un incremento considerable de la estimulación.

El lado plano del traductor se debe colocar sobre el músculo. El cable del traductor se debe fijar de tal manera que no se ejerza ninguna tracción sobre el traductor. Cuanto más alejado de los electrodos de estimulación se coloque más fuerte será la señal de aceleración del traductor (si es demasiado cerca o demasiado lejos aparece error en la pantalla) (215).

La extremidad utilizada para la medición de la aceleración ha de mantenerse inmovilizada durante todo el procedimiento. Cambios de posición pueden alterar de manera considerable la altura de la respuesta.

La resistencia de la piel consiste en la resistencia total del circuito estimulante, incluyendo la resistencia de los electrodos. El estimulador del equipo Tof-Guard es del tipo de corriente constante, lo cual quiere decir que el voltaje de estimulación aumenta automática y linealmente con la resistencia. Mientras el voltaje no exceda el valor máximo establecido, el estimulador podrá suministrar la corriente fijada. Para una corriente de 60 mA y un voltaje máximo de 300 V, la resistencia máxima será de 5 kohmios. Si la resistencia supera el valor antedicho, aparece la señal "Err 2" y se para la estimulación. Reduciendo la corriente o un cambio en la duración del impulso hace posible continuar con la estimulación. Una limpieza insuficiente de la piel puede ser la causa de una resistencia cutánea excesiva.

Una condición previa para todas las mediciones de las respuestas del Tof-Guard es que se haya alcanzado una estimulación supra máxima del nervio. Para obtener dicha estimulación con un mínimo de estímulo será necesario utilizar una reducida zona del electrodo de estimulación, para conseguir una elevada densidad de corriente y la colocación correcta de los electrodos de estimulación en relación con el nervio (215).

En los electrodos, la zona real activa depende del pequeño disco metálico circular situado debajo de la capa adhesiva y no de la superficie entera del electrodo. Esto conduce a la deseada elevada densidad de corriente. Cuando se incrementa la corriente de estimulación, la altura de la respuesta aumentará hasta un determinado nivel de corriente y, a continuación, permanecerá constante. En este punto, todas las fibras nerviosas habrán quedado estimuladas y no se desarrollará fuerza muscular adicional si se incrementa la corriente a un nivel más alto. Se ha conseguido una estimulación supramáxima.

En el equipo Tof-Guard, se ha seleccionado una corriente máxima de estimulación de 60 mA con una duración del impulso de 200 microsegundos.

La experiencia ha demostrado que, cuando la temperatura corporal se reduce durante una intervención quirúrgica, se hará necesario incrementar la corriente para mantener dicha estimulación supramáxima durante toda la operación. El paciente deberá ser anestesiado antes de que se ponga en marcha el estimulador, ya que la estimulación eléctrica puede resultar dolorosa si está consciente.

La respuesta de control es la altura de la respuesta al comienzo de la intervención. La altura de la respuesta control se halla fijada a 100% en el modo AUTO del monitor Tof (215).

A no ser que se adopte un cuidado especial durante el registro, es posible que la altura de la respuesta de control no retorne a su valor original después de un funcionamiento prolongado. En general, esto tiene escasa importancia, puesto que, en la evaluación de la recuperación, se utiliza el valor Tof y no el valor de la altura de la primera respuesta. Lo interesante de las mediciones Tof es la independencia del método de cualquier referencia a la altura de la respuesta de control (215).

B.- Técnica Experimental

En los experimentos, se han colocado los electrodos de estimulación en la cara externa del muslo derecho de los conejos, sobre el nervio ciático, el positivo en su salida a nivel de pelvis y el negativo a 3 centímetros por debajo. El traductor de aceleración se coloca en la cara anterior de la pierna, sobre el músculo extensor largo de los dedos y/o el músculo tibial anterior. El sensor de temperatura se coloca en la cara interna de la pierna derecha.

Se han practicado mediciones tras la anestesia (basal), a las 3, 4 y 5 horas de isquemia, a los 30 minutos de la revascularización y a la semana de la intervención. Y se aplicaron potencias de estimulación de 10, 20, 30, 40 y 50 mA con una duración de 200 microsegundos para cada estimulación,

expresándose la respuesta contráctil en % (Tabla XXI a XLIII; Fig.171 a 219).

2.9. GRUPOS EXPERIMENTALES

Para este estudio experimental se han empleado 3 grupos de 9 animales cada uno, **Tabla I**, para poder realizar diferentes comparaciones:

A.- Grupo A: 9 conejos perfundidos con suero fisiológico a temperatura ambiente, 20°C +/- 1°C, durante 3, 4 y 5 horas. Para cada tiempo de isquemia se han empleado 3 conejos.

B.- Grupo B: 9 conejos perfundidos con suero fisiológico mediante la técnica de la hipotermia intermedia (enfriamiento rápido de la extremidad, en primer lugar, con solución a 4°C +/- 1°C durante 60 a 90 minutos y mantenimiento, a posteriori, con suero a 10°C +/- 1°C), durante 3, 4 y 5 horas. Se utilizan 3 conejos para cada uno de los periodos de isquemia.

C.- Grupo C: 9 conejos perfundidos con suero fisiológico frío o helado, 4°C +/- 1°C, durante 3, 4 y 5 horas de isquemia. En cada grupo de isquemia se emplean 3 conejos.

Se canuló la vena femoral y se interrumpió el flujo sanguíneo (clamping de la arteria femoral) en las extremidades posteriores derechas de conejos, que contienen gran cantidad de tejido muscular.

El trabajo se ha realizado siguiendo las siguientes fases:

1ª) Anestesia y técnica quirúrgica: adiestramiento y aprendizaje.

2ª) Efectos de la hipotermia sobre el tiempo de isquemia: estudio bioquímico e histológico.

En principio, se definió la trayectoria horaria y el nivel de alteración metabólica del músculo en 27 extremidades traseras isquémicas de conejos a 22, 10 y 4 grados centígrados. A diferentes horas, 3, 4 y 5 horas, se midieron los niveles de adenosina trifosfato, fosfocreatina, fosfomonoésteres y el fósforo inorgánico de los músculos mediante la espectroscopia del fósforo con resonancia nuclear magnética y la cromatografía líquida de alta presión.

A continuación, se estudiaron las alteraciones bioquímicas sanguíneas encontradas con los tres diferentes métodos de enfriamiento y en los tres tiempos de isquemia.

Por último, se realizó un estudio de 28 biopsias musculares y 6 biopsias de nervio, para apreciar los cambios histoquímicos acaecidos y para comparar los beneficios metabólicos de los tres métodos diferentes de conservación de miembros.

3ª) Post-operatorio: complicaciones y estudios de la función neuro-muscular.

2.10. ESTADÍSTICA

Todos los datos se expresan como la **media +/- la desviación estandar**.

Se han realizado estudios entre grupos, para comparar variables cuantitativas, utilizando el método **MANOVA**, que consiste en el análisis de la **Varianza** (test paramétrico) de medidas repetidas, con un factor intra-sujetos y 2 factores inter-sujetos, y la determinación de los **Contrastes Multivariados**, valorando la relación existente entre el momento de la medición, el tiempo de isquemia y la temperatura de perfusión (Lambda de Wilks). Una p inferior a 0,01 ($p < 0,01$), se considera significativa desde el punto de vista estadístico. Y se ha utilizado, también, el test de **Kruskal-Wallis** (test no paramétrico y análogo al de la varianza, pero que no exige tantas variantes).

III.- RESULTADOS

3.1. RESULTADOS

A.- Animales utilizados

Se han utilizado 34 conejos en total, realizándose el experimento en 27 de ellos (9 grupos de 3 conejos cada uno, subdivididos en 3 grupos de suero perfundido a 20°, 10° y 4°C, y 3 grupos con tiempo de isquemia de 3, 4 y 5 h) y se excluyen a 7 conejos, **Tabla I**.

Los primeros 4 conejos han servido para poner a punto las distintas técnicas (quirúrgicas, químicas, serológicas, histológicas, etc). Han sido conejos machos, con un peso que oscilaba entre 3,550 kgr y 4,400 kgr y una temperatura anal entre 39,2°C y 39,8°C. En ellos se cronometraron los distintos tiempos quirúrgicos, como se hizo con todos los conejos, comprobamos que al canular la vena antes y por debajo de la arteria tenía menos riesgos (no se inclinaba tanto el trocar de la cánula de la vena femoral, evitando su perforación), se canulaba y se clampaba con mayor facilidad la arteria y se facilitaba la perfusión. Se ajustaron las dosis de anestesia necesarias para el mantenimiento de la misma y los tiempos en los que era preciso su aplicación. Se tomaron muestras del músculo gastrocnemio medial derecho, para su estudio histológico basal y para la preparación de las mezclas de disolución del músculo para el estudio con HPLC y RNM.

El conejo número 7 se sacrificó antes de terminar el experimento por ser pequeño, peso de 2,550 kgr, y presentar múltiples dificultades técnicas (perforación de vasos), anestésicas (precisaba dosis anestésicas con una periodicidad inferior a los 30 minutos, con despertares frecuentes y quejidos), etc.

A todos estos conejos se les perfundió con suero a 20°C y unos tiempos de isquemia de 1 a 2 1/2 h.

Los conejos numerados con el 33 y 34 fallecieron a las 48 horas de la isquemia. El número 33 (4,150 kgr y 39,3°C) se le perfundió con suero a 20°C y al número 34 (3,900 kgr y 39,5°C) con suero a 4°C, durante 5 h de isquemia. En ambos, las muestras de sangre a las 5 h presentaban mucha fibrina y la extremidad edematosa. A las 24 h presentaban cojera al caminar y edema de la extremidad. A las 36 h, secreción blanquecina por la nariz, taquipnea, taquicardia y somnolencia. A las 48 h fallecieron (la extremidad trasera tenía una diferencia de 3 cm con respecto a la toma basal en ambos). Los distintos valores serológicos que presentaba el número 33 fueron un pH basal de 7,334 y a los 30 min de revascularizar de 7,302; glucosa 435 y 84 mgr%; urea 24 y 46 mgr%; Ca^{2+} 14,3 y 11,4 mgr%; K^+ 3,7 y 5

mEq/L; GOT 26 y 82 UI/L; LDH 250 y 512 UI/L; CPK 3287 y 12220 UI/L, y la función neuro-muscular entre un 10 y un 25% de la inicial. El número 34 tenía un pH de 7,353 y 7,215; glucosa 393 y 210 mgr%; urea 31 y 59 mgr%; Ca^{2+} 13,4 y 10,9 mgr%; K^+ 3,9 y 4,3 mEq/L; GOT 20 y 41 UI/L; LDH 195 y 401 UI/L; CPK 4024 y 15002 UI/L, y la función neuro-muscular entre un 10 y un 30% de la basal.

Ambos conejos presentaron orina de color rosado al finalizar los tiempos de isquemia y al suturarlos.

La **temperatura anal** de los 27 conejos examinados osciló entre 39°C y 39,9°C y los **pesos** entre 3,150 kgr y 4,430 kgr. Los **diámetros de la extremidad posterior** variaron entre los 14,5 cm de muslo y 5 cm de metatarso del más pequeño a los 19 cm de muslo y 8 cm de metatarso en los más grandes. En los conejos perfundidos a 20°C las diferencias entre sus diámetros inicial y final fueron, para el grupo de 3 h de isquemia, 1 cm más para el muslo y 0,5 cm para el metatarso finalizada la isquemia, recuperando el mismo tamaño a la semana; para el grupo de 4 h, 1,5 a 2 cm más para el muslo y 1 a 2 cm para el metatarso en dicho tiempo y 1 cm más en el muslo y 0,5 cm en el metatarso a la semana; en el grupo de 5 h hay 2 a 2,5 cm más en el muslo y 1 a 2 cm en el metatarso en ese tiempo, siendo de 1 a 1,5 cm más en el muslo y de 0,5 a 1 cm en el metatarso a la semana. En los conejos perfundidos a 10°C e isquemia de 3 h presentan 0,5 a 1 cm más en el muslo y 0,5 cm en el metatarso en dicho momento, siendo iguales a los basales a la semana; con 4 h de isquemia aumenta de 1 a 1,5 cm el muslo y de 0,5 a 1 cm el metatarso en ese tiempo y de 0 a 1 cm más en el muslo y de 0 a 0,5 cm en el metatarso a la semana; con 5 h de isquemia se miden de 1 a 1,5 cm más en el muslo y de 0,5 a 1 cm en el metatarso en dicho tiempo y de 0,5 a 1 cm más en el muslo y de 0 a 0,5 cm en el metatarso a la semana. Con perfusión a 4°C e isquemia de 3 h miden 1 a 1,5 cm más el muslo y 0,5 a 1 cm el metatarso en ese tiempo y de 0,5 cm a 1 cm más en el muslo y de 0,5 a 1 cm más en el metatarso a la semana; con 4 horas de isquemia presentan 1,5 cm más en el muslo y de 0,5 a 1,5 cm en el metatarso en ese tiempo y de 0,5 a 1,5 cm más en el muslo y de 0,5 a 1,5 cm en el metatarso a la semana; con isquemia de 5 h hay de 1,5 a 2 cm más en el muslo y 1 cm en el metatarso en ese tiempo y 1 cm más en el muslo y 0,5 cm en el metatarso a la semana.

TABLA - I: NÚMERO DE CONEJOS UTILIZADOS

Tiempo (h)	Temperatura °C (+/- 1° C)		
	20°C	10°C	4°C
3h	C5, C6, C16	C12, C14, C20	C17, C19, C21
4h	C8, C10, C11	C13, C15, C23	C18, C22, C24
5h	C9, C25, C29	C26, C28, C30	C27, C31, C32

Cn: Número de conejo utilizado.

Total conejos: 34.

Exclusiones: 7 Mejora de la técnica: 4 (conejos 1, 2, 3 y 4).

Muertes: Intraoperatoria: 1 (conejo 7).

Postoperatoria (48 h.): 2 (conejos 33 y 34).

Conejos 1, 2, 3, 4 y 7: Isquemia inferior a 3 h..

Conejos 33 y 34: Isquemia de 5 h..

Conejos 1, 2, 3, 4, 7 y 33: Perfusión con suero a 20°C.

Conejo 34: Perfusión con suero a 4°C.

Conejo 7: Sacrificio por imposibilidad técnica, al ser de un tamaño y peso pequeños.

B.- Determinaciones de laboratorio

1.- Hematología

Los valores obtenidos son similares a los descritos por otros autores (224).

Los resultados del hemograma aquí expuestos son los valores medios de todos los conejos que se han utilizado. Sus valores son:

Hemograma: 6,25 +/- 1,5 Mill.Hemat.

13,4 +/- 2,7 gr% Hb.

41,8 +/- 8,6 % Hto.

64,1 +/- 6,1 fl VCM.

20,0 +/- 2,2 pg HCM.

1,2 +/- 1,2 gr% CHCM.

3 560 +/- 800 Leucocitos: 1 a 3 % Neutrófilos.

50 a 70 % Linfocitos.

30 a 48 % Monocitos.

0 a 2 % Eosinófilos.

2 a 8 % Basófilos.

397 000 +/- 140 000 Plaquetas.

5,1 +/- 1,1 fl VPM.

En 10 conejos se han determinado las proteínas y el proteinograma, siendo sus valores:

Proteínas: 5,4 +/- 0,6 gr% : 63 a 75 % Albúmina.

5 a 7 % A-1.

13 a 17 % A-2.

4 a 5 % B.

La relación Albúmina/Globulinas es de 2,4 a 3,1.

2.- pH

El pH oscila entre 7,319 y 7,466 en estado basal, siendo su media de 7,378 \pm 0,007. La media de todas las mediciones es de 7,305 \pm 0,004, siendo el pH medio total a 4°C de 7,297, el de 10°C de 7,311 y el de 20°C de 7,305 \pm 0,007, **Tabla II, Fig.24**.

Con isquemias de 3 horas, se aprecia un descenso del mismo al final de dicho periodo, siendo más acusado en los conejos perfundidos con suero a 20°C, desde 7,358 \pm 0,25 a 7,240 \pm 0,14, **Fig.14,19 y 20**, y suero a 4°C, de 7,379 \pm 0,15 a 7,267 \pm 0,24, **Fig.16,17 y 20**, que en los conejos perfundidos a 10°C, de 7,345 \pm 0,25 a 7,273 \pm 0,30, **Fig.15,18 y 20**. Tras la revascularización, la recuperación del pH es menor en los conejos con isquemia a 20°C (7,274 \pm 0,35) y 4°C (7,285 \pm 0,23) y mejor en los perfundidos con soluciones a 10°C (7,297 \pm 0,17), **Fig.20**. En todos los conejos se recuperó el pH, de manera aproximada, al cabo de 1 semana, 7,391 \pm 0,45 con 20°C; 7,356 \pm 0,50 con 10°C; 7,337 \pm 0,30 con 4°C, **Fig.20**. Cuando el tiempo de isquemia es de 4 horas los descensos del pH son más acusados, aunque similares, con los tres tipos de perfusión, de 7,425 a 7,223 \pm 0,17 con 20°C, **Fig.14,19 y 21**; de 7,412 \pm 0,58 a 7,220 \pm 0,15 con 10°C, **Fig.15,18 y 21**; de 7,371 \pm 0,43 a 7,238 \pm 0,36 con 4°C, **Fig.16,17 y 21**, pero su recuperación al cabo de 1 semana es mejor con perfusión a 10°C (7,418 \pm 0,39) y a 4°C (7,408 \pm 0,24) que a 20°C (7,357 \pm 0,24), **Fig.21**. La isquemia de 5 horas produce los mayores descensos del pH, más intensos con suero frío-helado, a 4°C, de 7,369 \pm 0,47 a 7,141 \pm 0,27, **Fig.16,17 y 22**; menor disminución con suero a 20°C, de 7,375 \pm 0,18 a 7,203 \pm 0,32, **Fig.14,19 y 22**, y el menor descenso es con perfusión a 10°C, de 7,370 \pm 0,51 a 7,206 \pm 0,88, **Fig.15,18 y 22**. Su recuperación a la semana es mejor con perfusión a 10°C, 7,365 \pm 0,21, menor con suero a 20°C, 7,348 \pm 0,25, y mucho menor con suero a 4°C, 7,301 \pm 0,25, **Fig.22**.

Las medias del pH, tomadas por tiempos de isquemia y por temperaturas de perfusión, quedan reflejadas en las **Fig.23 y 24**.

Considerando sólo los tiempos de isquemia, apreciamos como la isquemia de 3 horas presenta una mejor recuperación, con valores basales y a la semana superpuestos, con una menor recuperación a las 4 horas de isquemia y la peor recuperación es con isquemias de 5 horas, **Fig.23**.

Si sólo consideramos la temperatura de perfusión, apreciamos como con suero a 10°C se producen menores descensos del pH en todas las mediciones y una mejor recuperación a la semana, con una cifra superior a la basal, y disminuciones de las cifras del pH mayores con perfusión a 4°C y 20°C, que se comportan de manera similar, **Fig.24**.

En el análisis de la varianza y en el test de Kruskal-Wallis el descenso del pH está ligado más al tiempo transcurrido, siendo muy significativo ($p<0,001$), que a la temperatura ($p<0,4$), **Tabla III y IV**. En el análisis de los contrastes multivariados, relación del momento de la medida, el tiempo de isquemia transcurrido y la temperatura de perfusión en conjunto, es muy significativo ($p<0,007$) desde el punto de vista estadístico.

TABLA - II: pH EN FUNCIÓN DEL TIEMPO Y LA TEMPERATURA

Tiempo	pH			
		20° C	10° C	4° C
3h		C5	C12	C17
	Basal	7,328	7,352	7,396
	3h ISQ	7,224	7,301	7,245
	30' REV	7,233	7,306	7,275
3h	1 SEMANA	7,351	7,342	7,309
		C6	C14	C19
	Basal	7,373	7,319	7,365
	3h ISQ	7,253	7,240	7,294
3h	30' REV	7,295	7,277	7,312
	1 SEMANA	7,440	7,314	7,332
		C16	C20	C21
	Basal	7,372	7,364	7,375
3h	3h ISQ	7,244	7,278	7,262
	30' REV	7,295	7,309	7,269
	1 SEMANA	7,381	7,412	7,369
4h		C8	C13	C18
	Basal	7,406	7,466	7,420
	4h ISQ	7,212	7,205	7,241
	30' REV	7,254	7,248	7,261
4h	1 SEMANA	7,329	7,407	7,381
		C10	C15	C22
	Basal	7,428	7,349	7,341
	4h ISQ	7,215	7,236	7,200
4h	30' REV	7,236	7,294	7,192
	1 SEMANA	7,372	7,386	7,428
		C11	C23	C24
	Basal	7,441	7,420	7,351
4h	4h ISQ	7,243	7,218	7,273
	30' REV	7,250	7,219	7,301
	1 SEMANA	7,369	7,462	7,414
5h		C9	C26	C27
	Basal	7,385	7,427	7,422
	5h ISQ	7,194	7,116	7,166
	30' REV	7,217	7,149	7,246
5h	1 SEMANA	7,338	7,390	7,281
		C25	C28	C31
	Basal	7,353	7,358	7,330
	5h ISQ	7,177	7,292	7,112
5h	30' REV	7,213	7,295	7,213
	1 SEMANA	7,328	7,351	7,292
		C29	C30	C32
	Basal	7,386	7,326	7,355
5h	5h ISQ	7,239	7,210	7,144
	30' REV	7,228	7,217	7,211
	1 SEMANA	7,377	7,353	7,330

ISQ: Isquemia; REV: Revascularización.

Cn: Número de conejo utilizado.

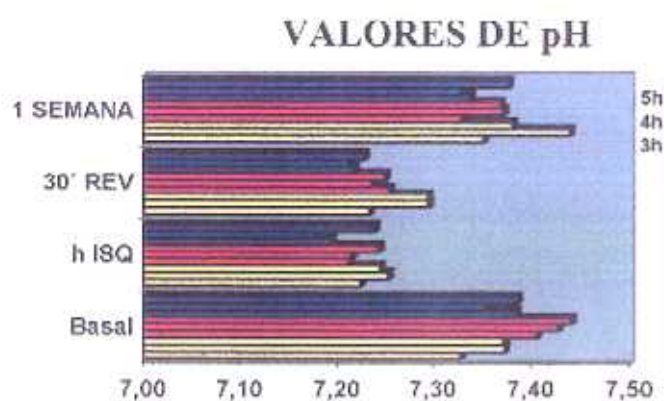


Fig.- 14. Temperatura: 20° C

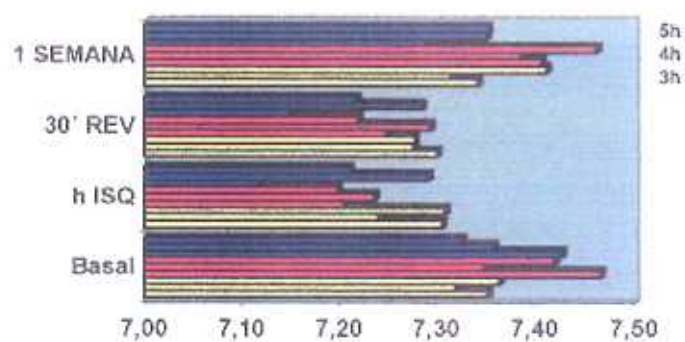


Fig.- 15. Temperatura: 10° C

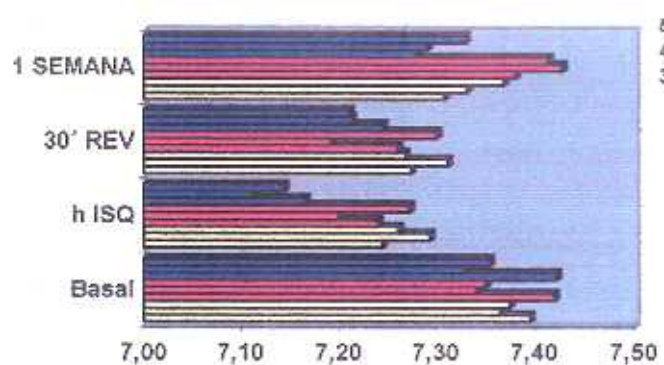


Fig.- 16. Temperatura: 4° C

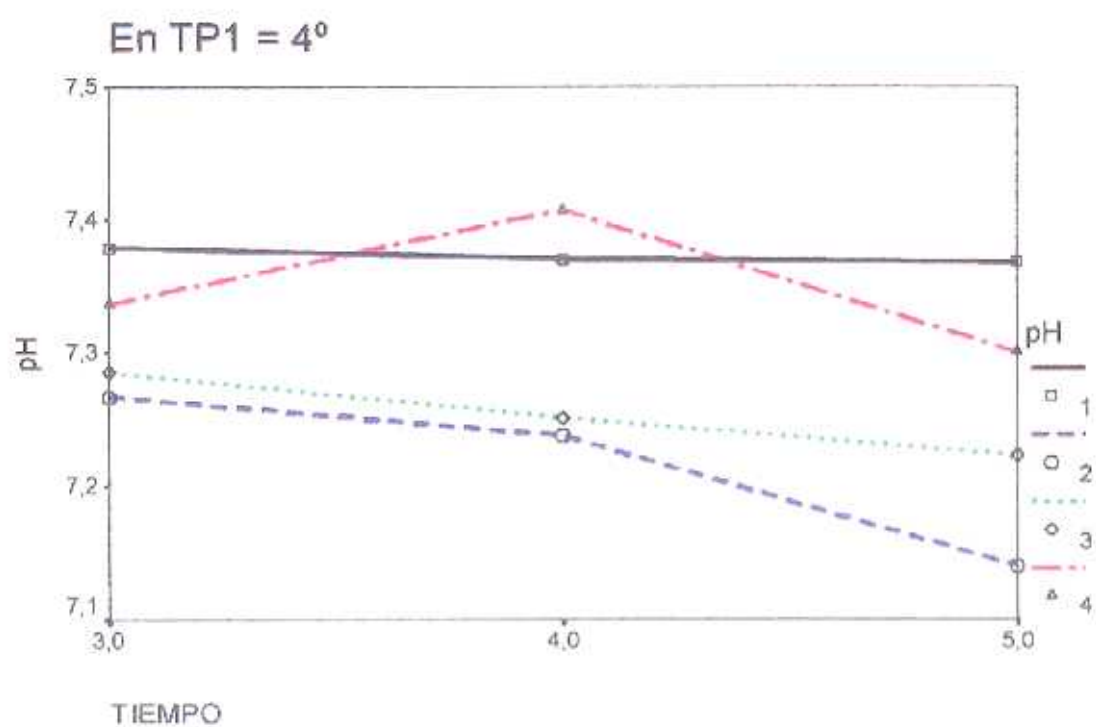


Fig.- 17. Suero a 4°C

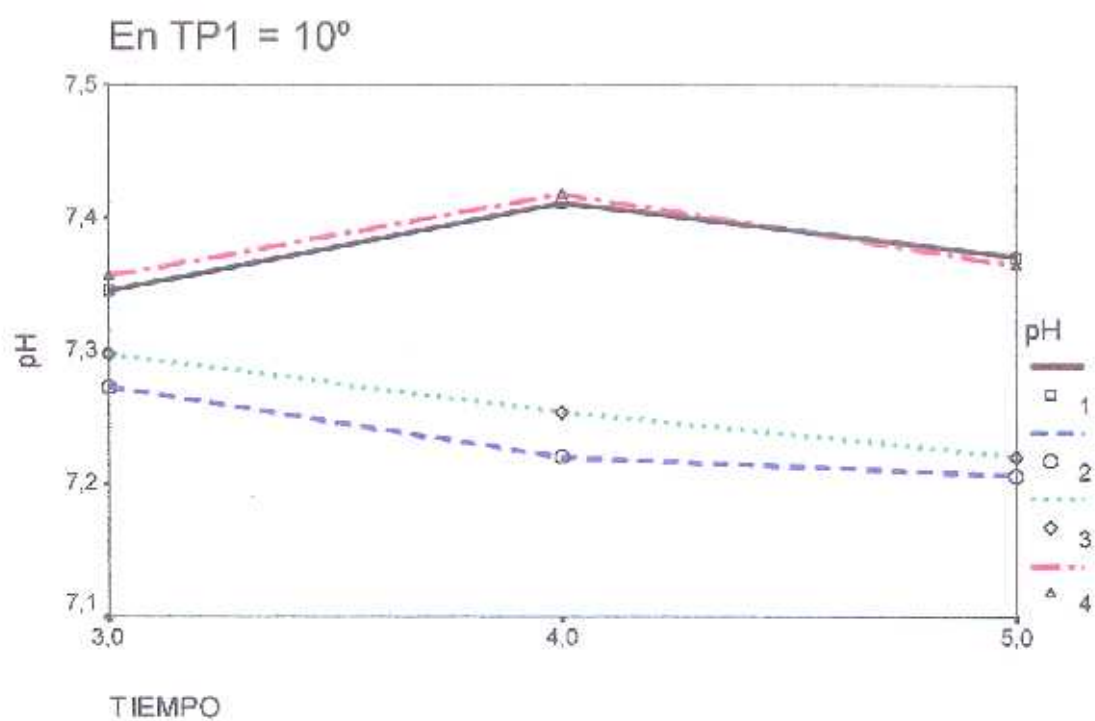


Fig.- 18. Suero a 10°C

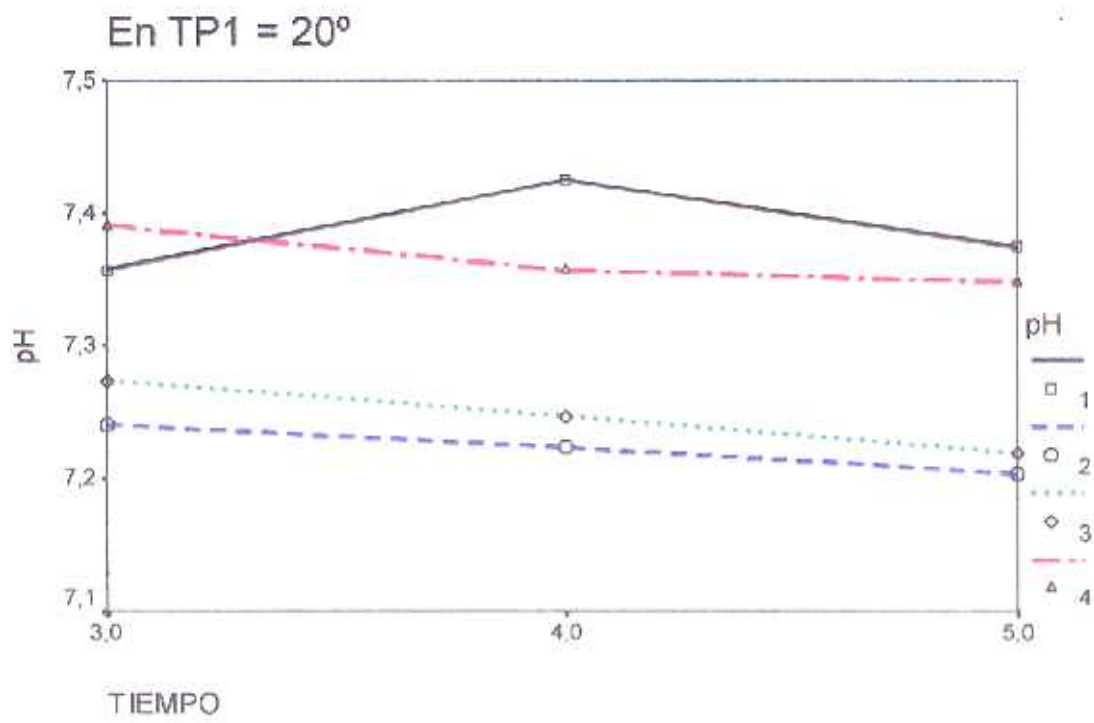


Fig.- 19. Suero a 20°C

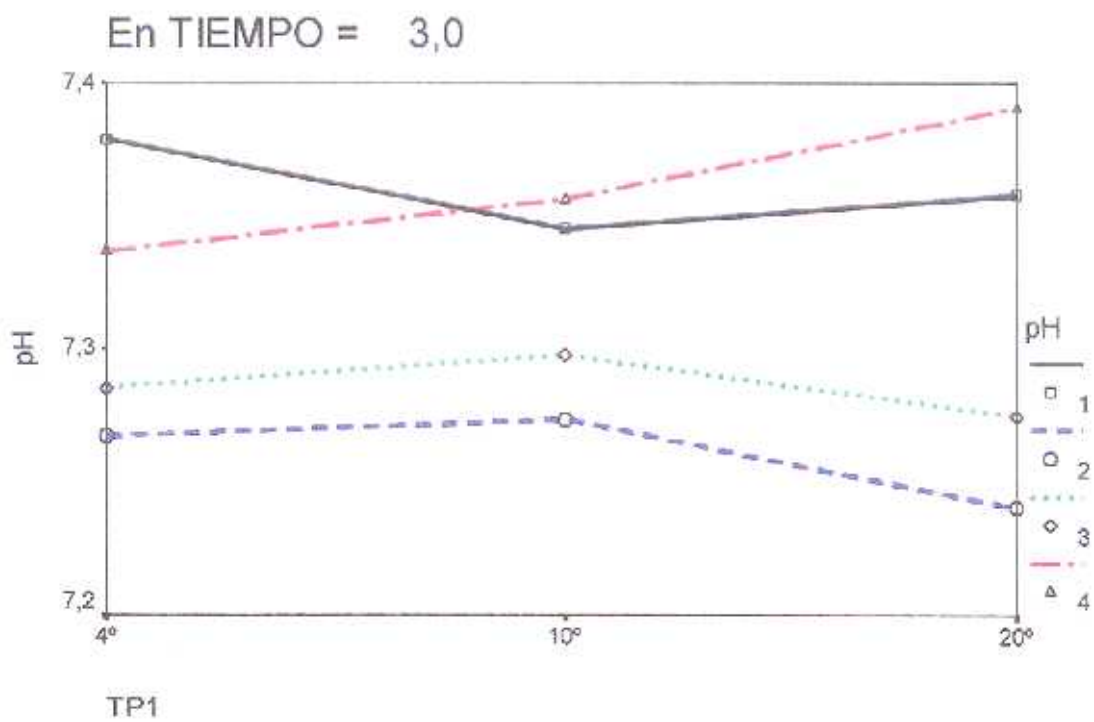


Fig.- 20. Isquemia de 3 h.

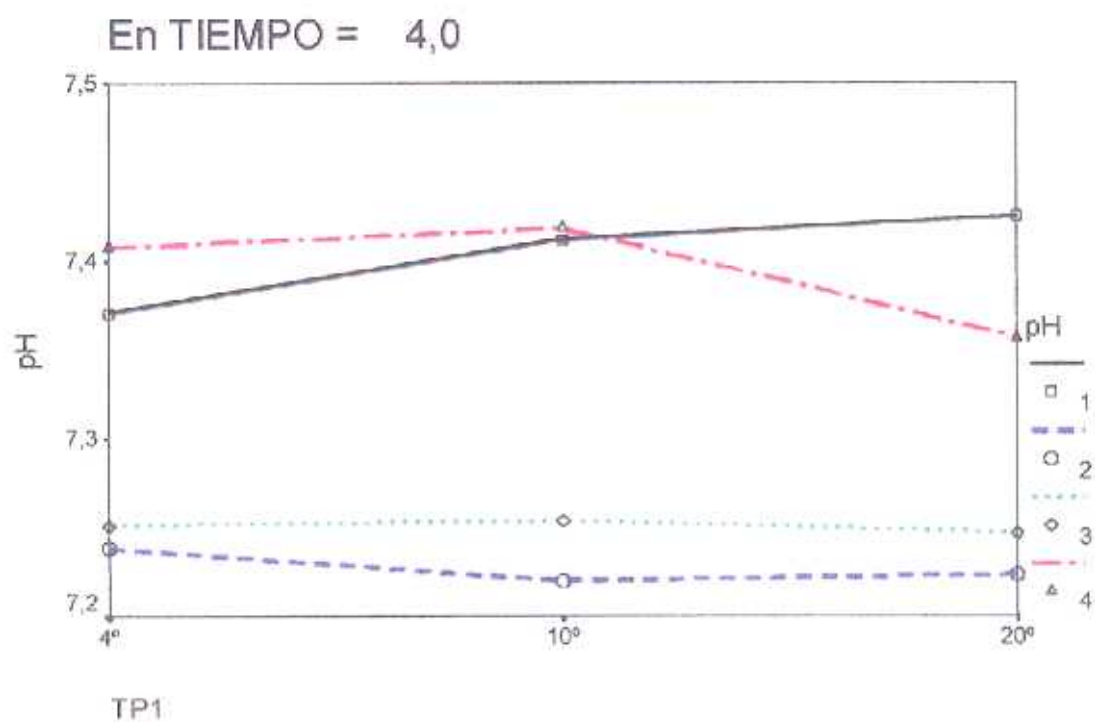


Fig.- 21. Isquemia de 4 h.

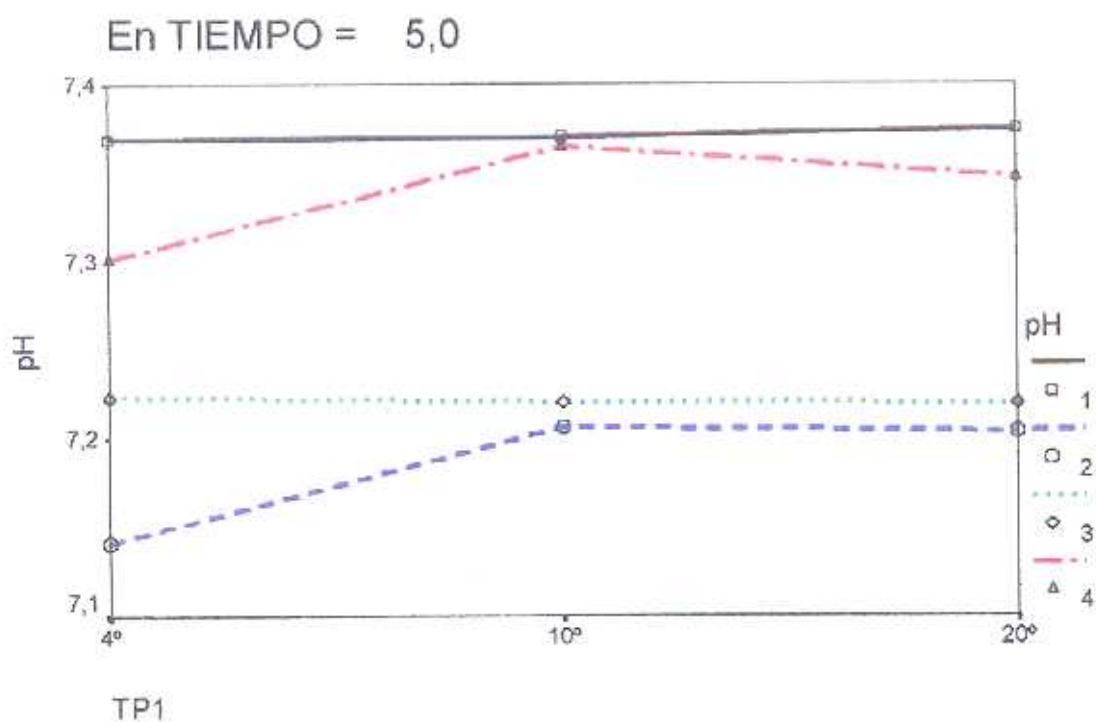


Fig.- 22. Isquemia de 5 h.

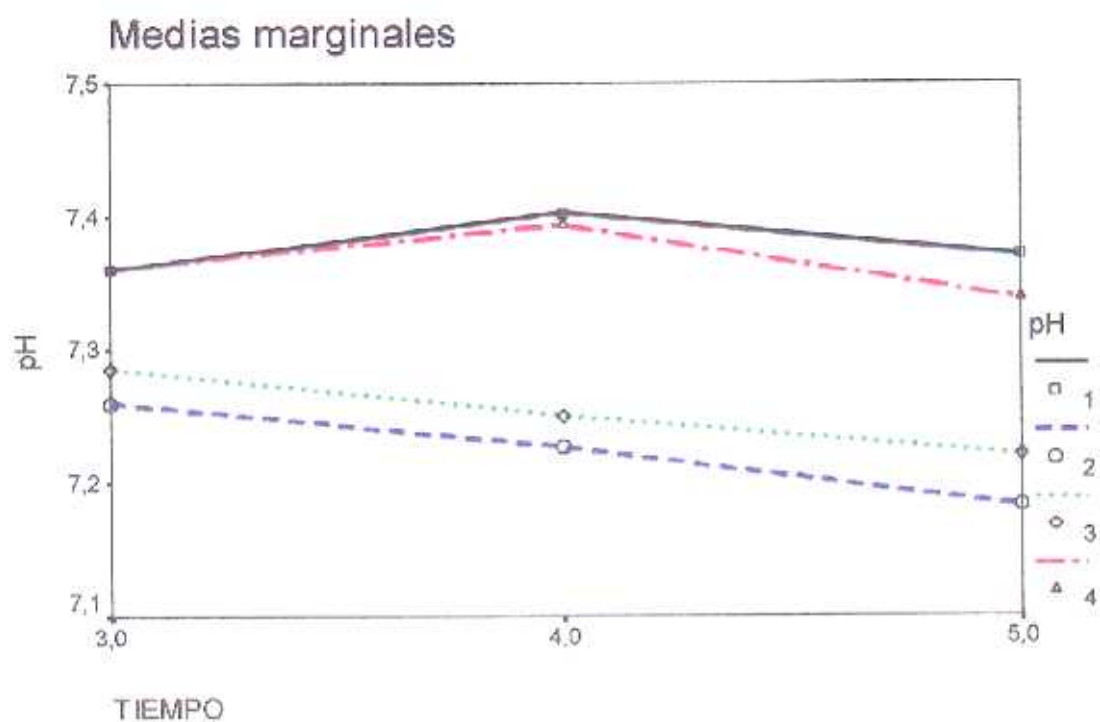


Fig.- 23. Tiempos de isquemia

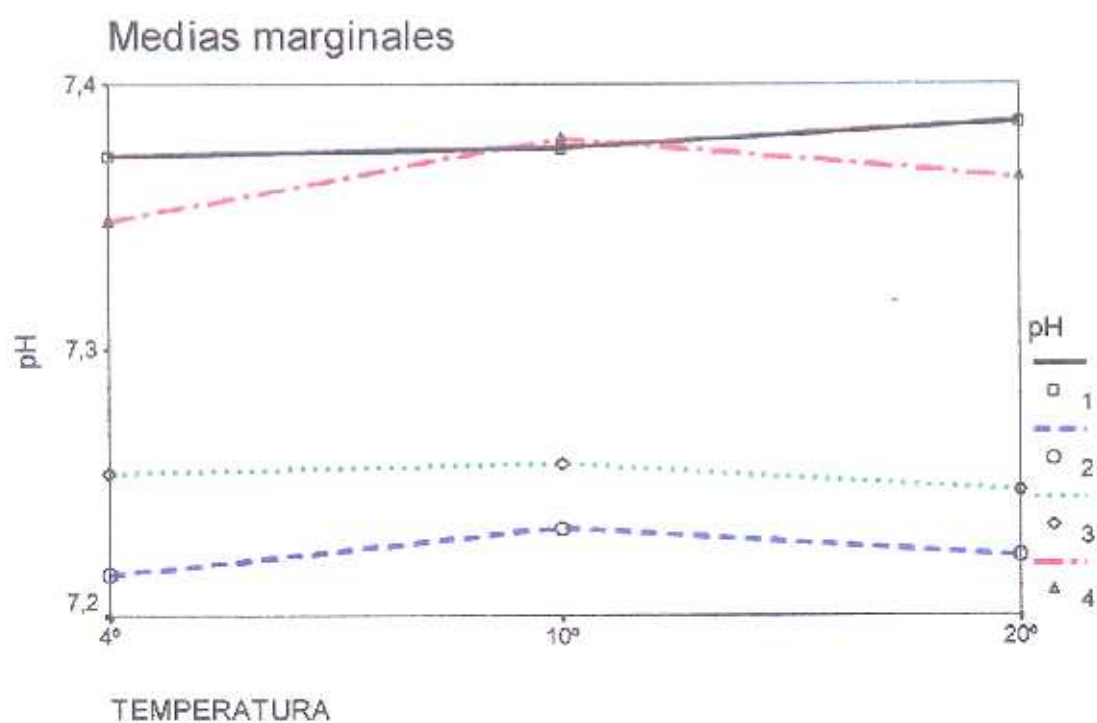


Fig.- 24. Temperaturas de perfusión

TABLA – III: Pruebas de efectos intra-sujetos.

Medida:

Esfericidad asumida

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
PH	,493	3	,164	141,455	,000	424,365	1,000
PH * TIEMPO	3,141E-02	6	5,234E-03	4,502	,001	27,010	,975
PH * TP1	3,665E-03	6	6,108E-04	,525	,787	3,152	,194
PH * TIEMPO * TP1	2,366E-02	12	1,972E-03	1,696	,094	20,352	,789
Error(PH)	6,279E-02	54	1,163E-03				

a. Calculado con alfa = ,05

TABLA – IV: Pruebas de los efectos inter-sujetos

Medida:

Variable transformada: Promedio

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
Intercept	1440,637	1	1440,637	3111947,762	,000	3111947,762	1,000
TIEMPO	9,296E-03	2	4,648E-03	10,040	,001	20,080	,965
TP1	8,701E-04	2	4,350E-04	,940	,409	1,880	,187
TIEMPO * TP1	1,199E-03	4	2,997E-04	,647	,636	2,590	,173
Error	8,333E-03	18	4,629E-04				

a. Calculado con alfa = ,05

3.- Serología

Cuando se somete al animal a una perfusión a 20°C se observa una disminución de todos los valores serológicos, más acusados cuanto mayor sea el tiempo de isquemia, **Tabla V**. La perfusión con suero a 10°C produce los menores descensos y una mejor capacidad de recuperación en las diferentes mediciones, muy manifiesto en su relación basal y a la semana de la isquemia, **Tabla VI**. La perfusión con suero a 4°C presenta unas cifras de serología similares a la perfusión a 20°C, aunque en ocasiones se comportan de manera inversa, **Tabla VII**.

La **GLUCOSA** basal oscila entre 473 y 237 mgr%, con un valor medio basal de 371,25 +/- 12,95 mgr%. La media total es de 251,36 +/- 7,14 mgr%, con unos valores medios totales para la perfusión con suero a 4°C de 248,75 mgr%, de 247,22 mgr% a 10°C y de 257,94 +/- 12,37 con suero a 20°C, **Fig.41**.

La isquemia de 3 horas y perfusión a 20°C produce un descenso de glucosa desde 438,33 +/- 8,5 hasta 212,66 +/- 92,08 mgr%, **Fig.25, 36 y 37**. Con suero a 10°C hay también una disminución, desde 327,33 +/- 127,35 hasta 196,66 +/- 26,38 mgr%, **Fig.28, 35 y 37**. Con suero a 4°C hay una mayor caída, desde 392 +/- 36,59 hasta 179 +/- 79,07 mgr%, **Fig.31, 34 y 37**. La recuperación al cabo de una semana tras perfundir con suero a 20°C es mejor, 335,40 +/- 40,79 mgr%, que la perfusión con suero a 10°C, 264 +/- 69,07 mgr%, y que con suero a 4°C, 251,33 +/- 13,5 mgr%, **Fig.37**. En la isquemia de 4 horas hay un mayor descenso, con perfusión a 20°C es desde 339,66 +/- 20,42 hasta 125 +/- 19,97 mgr%, **Fig.26, 36 y 38**. Con suero a 10°C disminuye desde 380,33 +/- 92,77 hasta 146 +/- 26,66 mgr%, **Fig.29, 35 y 38**. El mayor descenso se produce con sueros a 4°C, desde 400,66 +/- 14,18 hasta 130,33 +/- 27,39 mgr%, **Fig.32, 34 y 38**. Al cabo de una semana la recuperación es menor al perfundir con suero a 20°C, 235,33 +/- 50,02 mgr%, que con suero a 4°C, 247 +/- 64,21, y la mejor es con suero a 10°C, 257 +/- 37 mgr%, **Fig.38**. Con isquemias de 5 horas y perfusión a 20°C hay un menor descenso de la glucosa, desde 369,66 +/- 75,03 hasta 165,66 +/- 34,99 mgr%, **Fig.27, 36 y 39**, semejante a la perfusión con suero a 10°C, desde 333 +/- 81,18 hasta 128,33 mgr%, **Fig.30, 35 y 39**. Con sueros a 4°C se produce el mayor descenso, desde 360,33 +/- 41,05 hasta 135,66 +/- 11,01 mgr%, **Fig.33, 34 y 39**. A la semana, la peor recuperación se produce al perfundir con suero a 20°C, 209,66 +/- 32,57, mejor recuperación con suero a 4°C, 274,66 +/- 14,57, y la mayor recuperación se observa con la perfusión a 10°C, 282 +/- 54,02

mgr%, **Fig.39**.

Las medias de la glucosa, tomadas por tiempos de isquemia y por temperaturas de perfusión, se reflejan en las **Fig.40 y 41**.

Teniendo en cuenta sólo el tiempo de isquemia observamos que a las 3 horas se producen los menores descensos de la glucosa y una mejor recuperación a la semana, seguido de tiempos de isquemia de 5 horas, siendo la isquemia de 4 horas la que presenta mayores descensos y una menor recuperación a la semana, **Fig.40**.

Si es con respecto a la temperatura de perfusión, apreciamos que el suero a 10°C presenta las menores disminuciones de la glucosa en todas las mediciones, excepto en la basal que es inferior, y a la semana de la isquemia se recupera mejor. La perfusión con suero a 4°C y 20°C, que se comportan de manera similar, presentan cifras basales superiores, pero mayores descensos a posteriori y una menor recuperación a la semana, **Fig.41**.

En el análisis de la varianza y de Kruskal-Wallis las alteraciones en la medición de la glucosa están influidas más por el momento en que se realiza la medición, siendo muy significativo ($p<0,001$), y el tiempo de isquemia, siendo significativo ($p<0,05$), que por la temperatura, **Tabla VIII y IX**. La determinación de los contrastes multivariados presenta un nivel estadístico significativo ($p<0,01$).

Las mediciones de la **UREA** basal han oscilado entre 45 y 24 mgr%, con un valor medio basal de 31,33 +/- 0,98 mgr%. La media total es de 30,33 +/- 0,95 mgr%, con unos valores medios totales para la perfusión con suero a 4°C de 28,94 mgr%, con suero a 10°C de 30,08 y con suero a 20°C de 31,97 +/- 1,64 mgr%, **Fig.49**.

La isquemia de 3 horas a 20°C produce un descenso de la urea desde 35 +/- 7,81 hasta 29,66 +/- 9,50 mgr%, **Fig.44 y 45**. Con suero a 10°C desciende desde los 30,33 +/- 4,93 hasta 24,33 +/- 4,61 mgr%, **Fig.43 y 45**. Con suero a 4°C se producen los mayores descensos, desde 28,66 +/- 3,05 hasta 17,33 +/- 2,08 mgr%, **Fig.42 y 45**. A los 30 minutos de la reperfusión se produce un ascenso generalizado de las cifras de urea, 39,33 +/- 10,26 mgr% con suero a 20°C, 31,66 +/- 4,5 mgr% con perfusión a 10°C y 27,33 +/- 3,51 mgr% con suero a 4°C, **Fig.45**. A la semana de la isquemia los valores de la urea están muy próximos a los valores basales, 33,66 +/- 10,4 mgr% con suero a 20°C, 32 +/- 4,58 mgr% con suero a 10°C y 25,33 +/- 2,88 mgr% con suero a 4°C, **Fig.45**. Con tiempos de isquemia de 4 horas y perfusión

a 20°C se produce un descenso de la urea desde 29,66 \pm 5,5 hasta 22,33 \pm 5,5 mgr%, **Fig.44 y 46**. Con suero a 10°C decae desde 30,66 \pm 2,51 hasta 22,33 \pm 2,3 mgr%, **Fig.43 y 46**. Y la perfusión con suero a 4°C produce el mayor descenso, desde 32,66 \pm 4,16 hasta 18 \pm 1,73 mgr%, **Fig.42 y 46**. A los 30 minutos de la revascularización se produce un ascenso de todos los valores de la urea, 27,33 \pm 5,03 mgr% con suero a 20°C, 29 \pm 4 mgr% con suero a 10°C y 25,66 \pm 2,3 mgr% con suero a 4°C, **Fig.46**. A las 5 horas de isquemia y perfusión a 20°C la urea desciende desde los 29,66 \pm 4,04 hasta los 26,33 \pm 4,93 mgr%, **Fig.44 y 47**. Con suero a 10°C desciende desde 36 \pm 7,81 hasta 25,33 \pm 8,73 mgr%, **Fig.43 y 47**. Con suero a 4°C decae desde los 29,33 \pm 3,05 hasta 26 \pm 1,73 mgr%, **Fig.42 y 47**. A los 30 minutos de la revascularización la perfusión con suero a 20°C presenta unos valores próximos a los basales, 33,33 \pm 6,42 mgr%, con un aumento similar de los valores al perfundir con suero a 10°C, 40,67 \pm 8,96 mgr%, y con suero a 4°C, 38,33 \pm 1,52 mgr%, **Fig.47**. A la semana, la urea presenta sus máximas elevaciones, superiores a las cifras basales, al perfundir con sueros a 20°C, 41,33 \pm 7,02 mgr%, y aún mayores al utilizar suero a 4°C, 47 \pm 3,46 mgr%, obteniéndose valores próximos a los basales (leve descenso) al perfundir con suero a 10°C, 30 \pm 9,53 mgr%, **Fig.47**.

Las medias de la urea, tomadas por tiempos de isquemia y por temperaturas de perfusión, han sido recogidas en las **Fig.48 y 49**.

Con tiempos de isquemia de 3 horas la urea presenta unas cifras basales y a la semana muy parecidas, incluso algo menores a la semana, aunque a los 30 minutos de revascularización presentó cifras algo más elevadas; en la isquemia de 4 horas, se observa una disminución de los valores a los 30 minutos de la revascularización pero a la semana presenta valores próximos a los basales, algo más elevados; con 5 horas de isquemia se produce una elevación de los valores postrevascularización que perdura a la semana, **Fig.48**.

La perfusión con suero a 10°C presenta una elevación de la urea postrevascularización superior a la cifra basal, pero a la semana estos valores son inferiores a dicha cifra inicial, indicativos de una mejor recuperación que con los otros tipos de suero. La perfusión con sueros a 4°C y 20°C presentan un comportamiento muy parecido. El suero a 20°C produce menores descensos de la urea durante la isquemia y el suero a 4°C manifiesta los mayores descensos. Al revascularizar, en ambos se eleva la urea, que persiste a la semana (menos, con suero a 4°C), con valores superiores al suero a 10°C, **Fig.49**.

En el análisis de la varianza y de Kruskal-Wallis las variaciones de los valores de la urea son muy significativas ($p<0,001$) dependiendo del momento de la medición, del tiempo de la isquemia y de la temperatura de perfusión en conjunto. Similar a la determinación de los contrastes multivariados. De manera aislada, es muy significativo ($p<0,001$) dependiendo del momento de la medición, **Tabla X y XI**.

El **CALCIO** basal oscila entre 14,85 y 12,04 mgr%, con una media basal total de 13,82 \pm 0,15 mgr%. El valor medio total es de 11,73 \pm 0,16 mgr%, y para la perfusión a 4°C es de 11,71 mgr%, con suero a 10°C es de 11,37 mgr% y con suero a 20°C es de 12,11 \pm 0,28 mgr%, **Fig.57**.

La isquemia de 3 horas a 20°C produce un descenso del calcio desde 13,24 \pm 1,18 hasta 8,73 \pm 2,92 mgr%, con un ascenso a los 30 minutos de la revascularización, hasta 11,49 \pm 2 mgr%, **Fig.52 y 53**. Con suero a 10°C hay una disminución desde 13,22 \pm 1,39 hasta 10,18 \pm 1,26 mgr% y ascenso a los 30 minutos de la revascularización, 11,69 \pm 2,05 mgr%, **Fig.51 y 53**. Con perfusión a 4°C hay un descenso muy importante en las cifras del calcio, desde 14,36 \pm 0,23 hasta 6,9 \pm 0,87 mgr% y elevación posterior, a los 30 minutos de la revascularización, hasta 11,8 \pm 1,03 mgr%, **Fig.50 y 53**. A la semana, con suero a 20°C se observan cifras de 13,27 \pm 1,62 mgr%, con suero a 10°C presenta 12,94 \pm 1,37 mgr%, en ambos casos son cifras próximas a las basales, y con suero a 4°C hay una menor recuperación, 13,36 \pm 0,37 mgr%, **Fig.53**. La isquemia de 4 horas y perfusión a 20°C produce un descenso del calcio desde 13,78 \pm 1,17 hasta 8,13 \pm 0,58 mgr% y ascenso hasta 11,9 \pm 0,87 mgr% a los 30 minutos de la revascularización, **Fig.52 y 54**. Con suero a 10°C hay una disminución desde 14,06 hasta 7,23 \pm 0,4 mgr%, con elevación a los 30 minutos de la revascularización hasta 11,2 \pm 0,78 mgr%, **Fig.51 y 54**. Con perfusión a 4°C se producen oscilaciones similares a las anteriores, con una disminución desde 14,03 \pm 0,66 hasta 7,33 \pm 0,56 mgr% y un ascenso a los 30 minutos de la revascularización hasta 11,65 \pm 0,68 mgr%, **Fig.50 y 54**. A la semana, la perfusión con suero a 20°C presenta unas cifras de 15,39 \pm 0,78 mgr%, cifras muy superiores a las basales; con suero a 10°C hay un ascenso hasta 13,36 \pm 0,5 mgr%, inferior a la basal, y con suero a 4°C hay una elevación hasta 14,43 \pm 0,5 mgr%, superior a la basal, pero ambas están próximas a las cifras iniciales del calcio, **Fig.54**. Con tiempos de isquemia de 5 horas y perfusión a 20°C hay un descenso, menor que con el resto de los sueros, desde 14,65 \pm 0,5 hasta 10,06 \pm 0,25 mgr% y una

recuperación a los 30 minutos de la revascularización hasta $11,47 \pm 0,65$ mgr%, **Fig.52 y 55**. Con suero a 10°C hay una caída muy superior al resto, desde $13,13 \pm 0,3$ hasta $6,46 \pm 0,2$ mgr%, con elevación posterior, superior al resto de las perfusiones, a $10,1 \pm 0,95$ mgr% a los 30 minutos de la revascularización, **Fig.51 y 55**. Con suero a 4°C hay una caída importante en las cifras del calcio, pero menor que la anterior, desde $13,9 \pm 0,2$ hasta $8,66 \pm 0,5$ mgr%, con elevación a los 30 minutos de la revascularización hasta $10,47 \pm 0,8$ mgr%, **Fig.50 y 55**. A la semana, la perfusión con suero a 20°C presenta unas cifras de $13,19 \pm 0,79$ mgr%, muy por debajo del valor basal; la perfusión con suero a 10°C presenta unos valores de $12,86 \pm 0,35$ mgr%, por debajo pero próxima al valor basal, y la perfusión con suero a 4°C presenta unas cifras de $13,7 \pm 0,17$ mgr%, por debajo pero cercana al valor basal, **Fig.55**.

Las medias del calcio, tomadas por tiempos de isquemia y por temperaturas de los sueros perfundidos, se expresan en las **Fig.56 y 57**.

Con tiempos de isquemia de 3 y 5 horas los valores del calcio a la semana son inferiores a los basales, con mayor descenso a las 5 horas, pero la isquemia de 4 horas presenta elevación de sus cifras a la semana, **Fig.56**.

Con perfusión a 10°C no se han encontrado elevaciones del calcio por encima de los valores basales, en las mediciones realizadas a la semana del experimento, con ninguno de los tres tiempos de isquemia, **Fig.51**. Con sueros 4°C , sólo presenta a la semana unas cifras superiores a las basales con tiempos de 4 horas de isquemia, **Fig.50**. Con perfusión a 20°C , a la semana observamos cifras superiores a las basales después de 3 y 4 horas, en este momento muy superiores, de isquemia, con cifras inferiores tras 5 horas de isquemia, **Fig.52**. Tomadas todas las mediciones por grupos de perfusión, las cifras de calcio al cabo de una semana están próximas a las basales, **Fig.57**.

Mediante el análisis estadístico observamos que hay un nivel muy significativo ($p<0,001$) con respecto al tiempo, siendo significativo ($p<0,02$) en relación a la temperatura de perfusión y un nivel muy significativo ($p<0,001$) si se tiene en cuenta el momento de la medición, el tiempo de isquemia y la temperatura de perfusión, **Tabla XII y XIII**.

El POTASIO basal oscila entre 5,35 y 3,4 mEq/L, con una media basal total de $3,99 \pm 0,86$ mEq/L. El valor total medio es de $3,88 \pm 0,13$ mEq/L, y para la perfusión con suero a 4°C es de 3,79 mEq/L,

con suero a 10°C de 3,88 mEq/L y con perfusión a 20°C de 3,96 +/- 0,22 mEq/L, **Fig.65**.

Los periodos de 3 horas de isquemia y perfusión a 20°C producen un descenso desde 3,86 +/- 0,35 hasta 3,03 +/- 0,65 mEq/L, con una elevación a los 30 minutos de la revascularización, 3,65 +/- 0,38 mEq/L, **Fig.60 y 61**. Con suero a 10°C hay una elevación de las cifras, desde 4,31 +/- 0,91 hasta 5,44 +/- 0,47 mEq/L, con descenso a los 30 minutos de la revascularización, 4,01 +/- 0,83 mEq/L, **Fig.59 y 61**. Con perfusión a 4°C hay un gran descenso del potasio, desde 4,03 +/- 0,3 hasta 2,83 +/- 0,3 mEq/L y un importante ascenso a los 30 minutos de la revascularización, 4,23 +/- 0,3 mEq/L, **Fig.58 y 61**. A la semana del experimento, las cifras están cercanas a las basales, teniendo unos valores para la perfusión con suero a 20°C de 4,03 +/- 0,88 mEq/L, para suero a 10°C de 4,45 +/- 0,95 mEq/L y para suero a 4°C de 4,06 +/- 0,57 mEq/L, **Fig.61**. Con 4 horas de isquemia a 20°C hay un descenso desde 3,85 +/- 0,32 hasta 3,2 +/- 0,34 mEq/L, elevándose a los 30 minutos de la revascularización, 3,96 +/- 0,33 mEq/L, **Fig.60 y 62**. Con suero a 10°C y 4°C hay una disminución importante de los valores del K⁺, siendo más acusada con suero a 4°C, y una recuperación postrevascularización similar. Para el suero a 10°C hay un descenso desde 3,88 +/- 0,43 hasta 2,6 +/- 0,17 mEq/L, con elevación hasta 3,7 +/- 0,2 mEq/L posterior, **Fig.59 y 62**. Para suero a 4°C hay una caída desde 4,06 +/- 0,3 hasta 2,6 +/- 0,17 mEq/L y posterior aumento hasta 3,67 +/- 0,11 mEq/L, **Fig.58 y 62**. A la semana, los tres tipos de perfusión presentan valores superiores a los basales, para el suero a 20°C de 4,48 +/- 0,88 mEq/L, el suero a 10°C de 4,15 +/- 0,31 mEq/L y con suero a 4°C de 4,26 +/- 0,11 mEq/L, **Fig.62**. Con tiempos de isquemia de 5 horas y 20°C de perfusión hay los mayores descensos del K⁺, desde 4,23 +/- 0,49 hasta 3,23 +/- 0,35 mEq/L, y las cifras más elevadas a los 30 minutos de la revascularización, 5,65 +/- 0,3 mEq/L, **Fig.60 y 63**. Con suero a 10°C y 4°C hay menores descensos y unas recuperaciones postrevascularización cercanas a los valores basales. Con suero a 10°C hay un descenso desde 3,63 +/- 0,32 hasta 2,83 +/- 0,35 mEq/L y elevación posterior a 3,63 +/- 0,45 mEq/L, **Fig.59 y 63**. Con suero a 4°C desciende desde 4,1 +/- 0,1 hasta 3,3 +/- 0,2 mEq/L y ascenso posterior hasta 4,1 +/- 0,17 mEq/L, **Fig.58 y 63**. A la semana, todos los valores del K⁺ son superiores a los basales, con cifras mayores para la perfusión con suero a 20°C, 4,39 +/- 0,27 mEq/L, y suero a 4°C, 4,26 +/- 0,57 mEq/L, que para suero a 10°C, 3,9 +/- 0,1 mEq/L, **Fig.63**.

Las medias del potasio, tomadas por tiempos de isquemia y por temperaturas de perfusión, se hallan en

las Fig.64 y 65.

Todos los conejos presentaron elevaciones del potasio, con respecto al valor basal, a la semana del experimento. La perfusión con suero a 10°C produce un ascenso importante del K^+ a las 3 horas, superior al de los otros métodos de perfusión, para luego presentar las menores elevaciones y una mejor recuperación a la semana, Fig.59,61,62 y 63. La perfusión con 4°C y 20°C tienen un comportamiento similar, con un mayor descenso del K^+ a las 3 horas de isquemia con suero a 4°C, ascensos posteriores al revascularizar y mayores elevaciones a las 4 y 5 horas de isquemia, más manifiesto con suero a 20°C. A la semana, permanecen elevados, con menor recuperación que al perfundir con suero a 10°C, y algo más elevado para el suero a 20°C, Fig.58,60,61,62 y 63. Tomadas todas las mediciones por tiempos de isquemia, apreciamos un mayor ascenso del potasio con tiempos de 4 horas de isquemia, estando menos elevado con tiempos de 3 y 5 horas de isquemia, Fig.64. Si las mediciones son por grupos de perfusión, se aprecia una menor elevación con suero a 10°C, algo más elevado con suero a 4°C, pero con valores cercanos al anterior, y mayor elevación al perfundir con suero a 20°C, pero todas están próximas a las cifras basales, Fig.65.

Mediante el análisis estadístico se observa que las variaciones del potasio sólo están influidas por el momento de la medición, siendo muy significativo ($p<0,001$), sin influir el tiempo de isquemia ni la temperatura de perfusión, Tabla XIV y XV.

TABLA - V: SEROLOGÍA (VALORES OBTENIDOS A UNA TEMPERATURA DE 20° C, +/-1° C)

Tiempo	SEROLOGÍA								
		Glucosa mg %	Urea mg %	Creatinina mg %	Ca ²⁺ mg %	K ⁺ mEq/L	GOT UI/L	LDH UI/L	CPK UI/L
3h	C5 Basal	438	40		12,04	3,46	43	271	4377
	3h ISQ	159	30		6,77	2,31	27	307	7760
	30' REV	219	42		10,16	3,46	56	350	9600
	1 SEMANA	330	42		12,01	3,96	32	261	3360
3h	C6 Basal	430	26		13,30	4,12	19	334	5725
	3h ISQ	160	20		7,34	3,59	18	332	6033
	30' REV	220	28		10,53	4,09	43	381	9190
	1 SEMANA	298	22		12,71	4,13	36	579	4775
3h	C16 Basal	447	39		14,40	4,00	20	168	3319
	3h ISQ	319	39		12,10	3,20	22	203	4510
	30' REV	385	48		13,80	3,40	38	308	7788
	1 SEMANA	379	37		15,10	4,00	29	198	5444
4h	C8 Basal	325	30		14,85	4,13	14	158	1746
	4h ISQ	120	26		7,55	3,50	36	218	5163
	30' REV	197	32		12,90	3,97	51	312	7450
	1 SEMANA	227	35		14,90	4,51	32	402	2550
4h	C10 Basal	363	24		13,96	3,50	15	237	3775
	4h ISQ	108	16		8,14	2,83	32	351	17300
	30' REV	158	22		11,50	3,63	62	579	19970
	1 SEMANA	289	39		14,98	4,55	38	655	4775
4h	C11 Basal	331	35		12,53	3,92	25	208	3645
	4h ISQ	147	25		8,71	3,29	27	160	4245
	30' REV	186	28		11,30	4,30	39	236	5510
	1 SEMANA	190	34		16,29	4,38	23	169	1835
5h	C9 Basal	392	32		14,65	4,80	18	243	4044
	5h ISQ	138	32		10,30	3,60	77	369	9322
	30' REV	183	36		10,72	3,75	90	409	12848
	1 SEMANA	195	42		12,29	4,08	10	89	1505
5h	C25 Basal	431	32	1,2	14,60	4,00	31	292	5285
	5h ISQ	154	24	0,4	10,10	2,90	61	387	9555
	30' REV	184	38	0,4	11,80	4,12	103	400	14330
	1 SEMANA	247	48	1,1	13,80	4,60	14	125	2286
5h	C29 Basal	286	25	1,3	14,70	3,90	19	232	2645
	5h ISQ	205	23	0,9	9,80	3,20	32	287	9030
	30' REV	259	26	1,2	11,90	4,10	57	364	12990
	1 SEMANA	187	34	1,2	13,50	4,50	13	107	940

ISQ: Isquemia; REV: Revascularización.

Cn: Número de conejo utilizado.

VALORES SEROLÓGICOS A 20° C

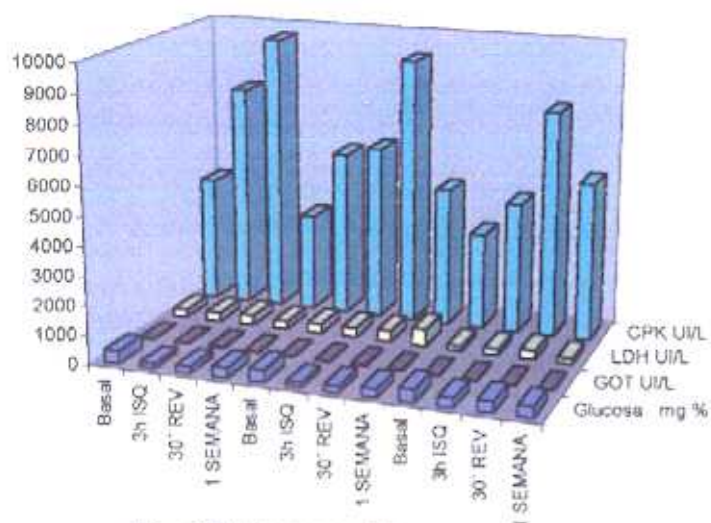


Fig.-25. Tiempo: 3h

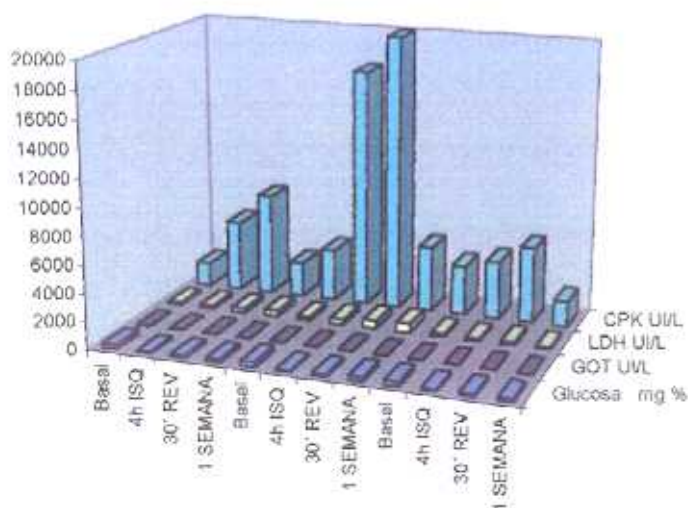


Fig.-26. Tiempo: 4h

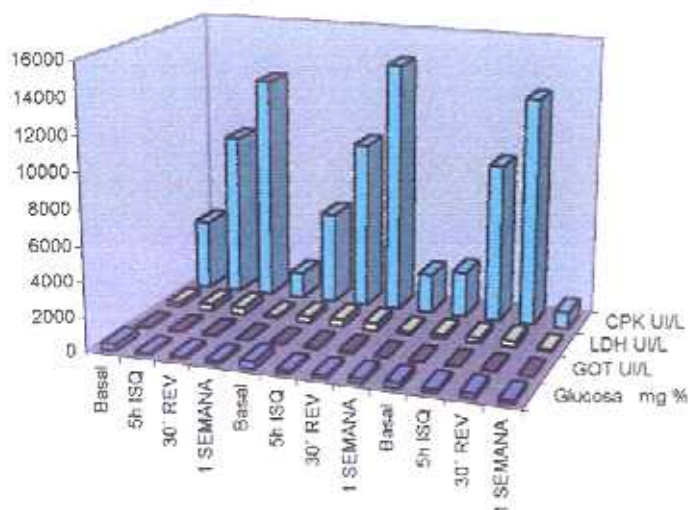


Fig.-27. Tiempo: 5h

TABLA - VI: SEROLOGÍA (VALORES OBTENIDOS A UNA TEMPERATURA DE 10 ° C, +/- 1 ° C)

Tiempo	SEROLOGÍA								
		Glucosa mg %	Urea mg %	Creatinina mg %	Ca ²⁺ mg %	K ⁺ mEq/L	GOT UI/L	LDH UI/L	CPK UI/L
3h	C12 Basal	237	27		11,62	5,35	28	181	1728
	3h ISQ	184	19		9,15	3,93	25	205	2686
	30' REV	194	32		10,63	4,43	44	301	5703
	1 SEMANA	203	27		11,36	5,55	26	154	1981
3h	C14 Basal	272	36		14,14	3,60	21	191	1728
	3h ISQ	227	27		11,60	2,50	21	211	2686
	30' REV	237	37		14,06	3,30	34	274	4017
	1 SEMANA	250	33		13,86	3,80	21	175	1963
3h	C20 Basal	473	38	1,6	13,90	4,00	20	246	4142
	3h ISQ	179	27	0,7	9,80	2,90	19	238	7920
	30' REV	202	36	1,1	10,40	3,80	35	313	12205
	1 SEMANA	339	36	1,2	13,60	4,00	17	215	3543
4h	C13 Basal	463	31		13,70	4,36	17	109	2936
	4h ISQ	167	25		7,60	2,50	17	124	4411
	30' REV	257	33		11,70	3,70	27	180	7890
	1 SEMANA	294	30		12,90	3,87	16	108	2668
4h	C15 Basal	398	33		14,70	3,80	14	122	1799
	4h ISQ	155	21		6,80	2,50	13	135	4580
	30' REV	214	29		11,60	3,50	25	234	7330
	1 SEMANA	257	29		13,90	4,50	11	112	1550
4h	C23 Basal	280	28	1,0	13,80	3,50	15	206	3051
	4h ISQ	116	21	0,4	7,30	2,80	13	226	4858
	30' REV	152	25	0,7	10,30	3,90	23	314	8470
	1 SEMANA	220	27	1,1	13,30	4,10	12	175	2745
5h	C26 Basal	314	31	1,7	13,40	3,50	19	240	4236
	5h ISQ	107	18	0,5	6,20	3,20	36	359	8243
	30' REV	242	35	1,3	9,00	4,10	49	433	12415
	1 SEMANA	284	29	1,3	12,90	4,00	18	228	3465
5h	C28 Basal	422	32	1,8	12,80	4,00	18	183	3541
	5h ISQ	150	23	0,7	6,60	2,80	27	264	5167
	30' REV	260	36	1,5	10,70	3,60	36	403	12325
	1 SEMANA	335	21	1,8	12,50	3,90	20	172	3145
5h	C30 Basal	263	45	1,8	13,20	3,40	17	182	4097
	5h ISQ	128	35	0,5	6,60	2,50	15	294	9310
	30' REV	198	51	0,8	10,60	3,20	24	482	16055
	1 SEMANA	227	40	1,3	13,20	3,80	16	169	3453

ISQ: Isquemia; REV: Revascularización.

Cn: Número de conejo utilizado.

VALORES SEROLÓGICOS A 10 ° C

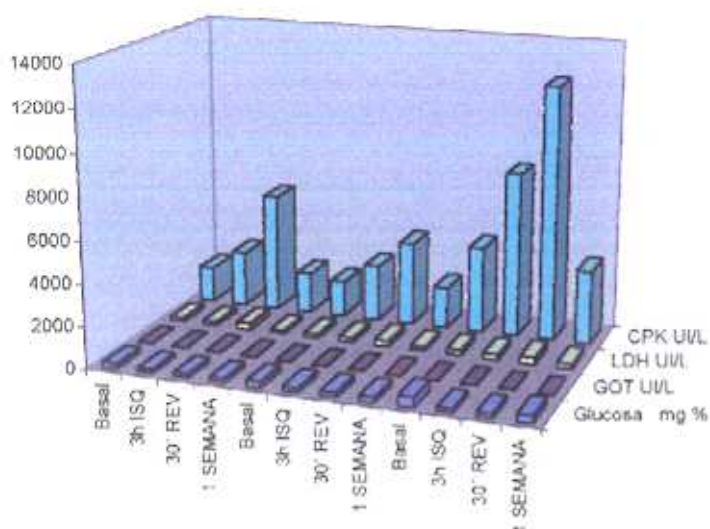


Fig.-28. Tiempo: 3h

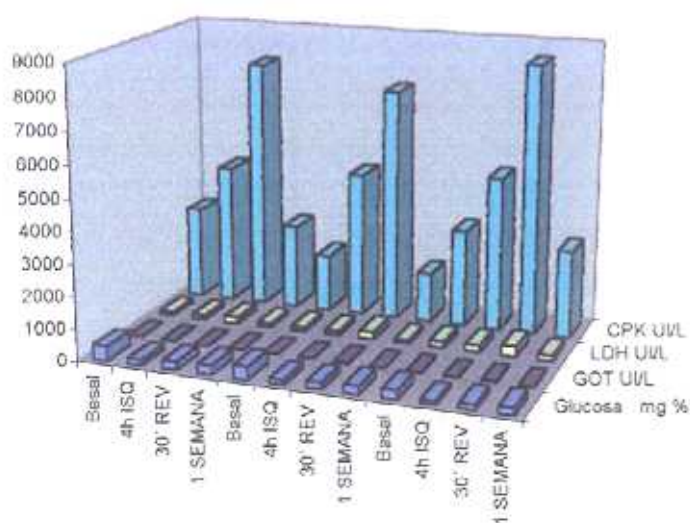


Fig.-29. Tiempo: 4h

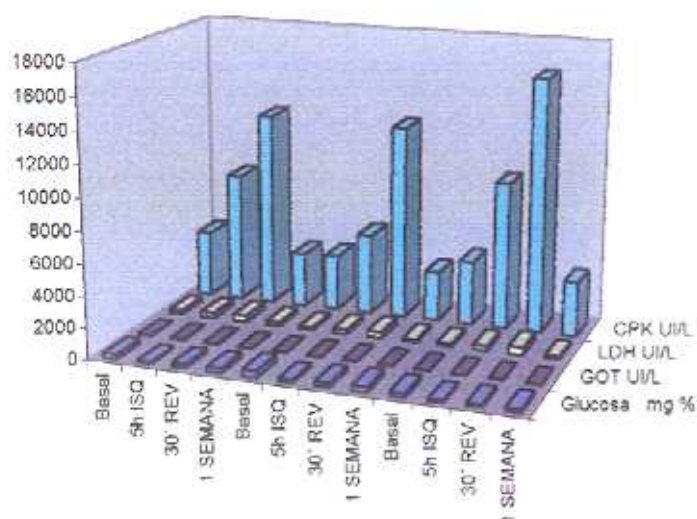


Fig.-30. Tiempo: 5h

TABLA - VII: SEROLOGÍA (VALORES OBTENIDOS A UNA TEMPERATURA DE 4° C, +/- 1° C)

Tiempo	SEROLOGÍA									
			Glucosa mg %	Urea mg %	Creatinina mg %	Ca ²⁺ mg %	K ⁺ mEq/L	GOT UI/L	LDH UI/L	CPK UI/L
3h	C17	Basal	357	26		14,50	3,70	19	184	2179
		3h ISQ	127	15		6,30	2,50	13	163	3447
		30' REV	227	24		12,40	3,90	37	330	12112
		1 SEMANA	238	22		13,80	4,00	14	112	1022
3h	C19	Basal	389	32	1,1	14,50	4,10	25	204	5402
		3h ISQ	140	18	0,6	7,90	3,10	25	189	7235
		30' REV	245	31	0,8	12,40	4,50	43	443	15855
		1 SEMANA	265	27	0,9	13,10	4,10	17	144	7460
3h	C21	Basal	430	28	1,3	14,10	4,30	23	193	4762
		3h ISQ	270	19	0,5	6,50	2,90	15	148	4084
		30' REV	285	27	0,9	10,60	4,30	31	265	11520
		1 SEMANA	251	27	0,9	13,20	4,10	15	137	2881
4h	C18	Basal	398	28		13,30	3,80	31	278	5415
		4h ISQ	125	17		6,70	2,80	29	279	9020
		30' REV	181	23		10,86	3,61	42	316	15275
		1 SEMANA	189	27		13,90	4,20	15	176	2927
4h	C22	Basal	416	34	1,1	14,20	4,00	14	256	1205
		4h ISQ	160	17	0,5	7,50	2,50	17	296	4344
		30' REV	193	27	0,8	12,00	3,80	24	367	11415
		1 SEMANA	236	33	1,2	14,50	4,20	16	217	1533
4h	C24	Basal	388	36	1,3	14,60	4,40	22	266	5322
		4h ISQ	106	20	0,5	7,80	2,50	39	281	7090
		30' REV	156	27	0,8	12,10	3,60	45	346	11810
		1 SEMANA	316	35	1,2	14,90	4,40	24	236	3396
5h	C27	Basal	395	32	1,5	13,70	4,00	28	243	3663
		5h ISQ	147	28	1,1	9,20	3,50	35	381	12100
		30' REV	179	37	1,0	9,92	4,31	62	403	13880
		1 SEMANA	281	51	1,2	13,50	4,30	30	203	2999
5h	C31	Basal	315	30	1,3	13,90	4,20	34	255	4632
		5h ISQ	125	25	0,8	8,60	3,30	43	369	10290
		30' REV	179	40	1,1	10,10	4,01	68	432	12987
		1 SEMANA	258	45	1,3	13,80	4,30	37	251	3113
5h	C32	Basal	371	26	1,5	14,10	4,10	30	212	4532
		5h ISQ	135	25	0,8	8,20	3,10	41	312	10440
		30' REV	197	38	1,1	11,40	4,00	62	401	12878
		1 SEMANA	285	45	1,6	13,80	4,20	33	197	3264

ISQ: Isquemia; REV: Revascularización.

Cn: Número de conejo utilizado.

VALORES SEROLÓGICOS A 4 ° C

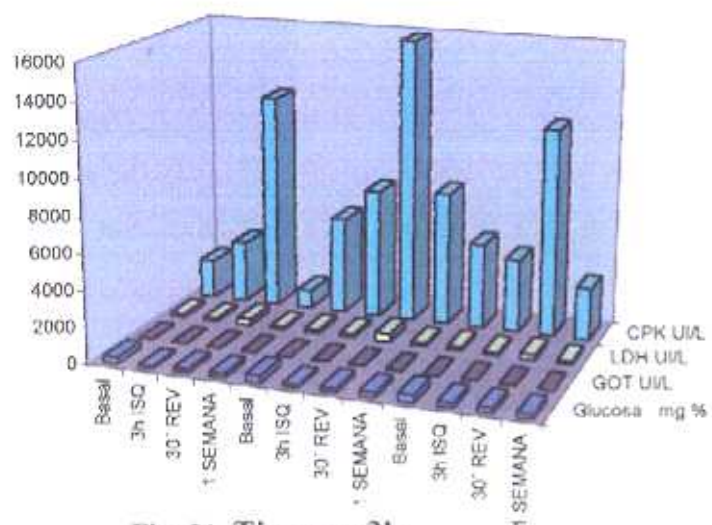


Fig.-31. Tiempo: 3h

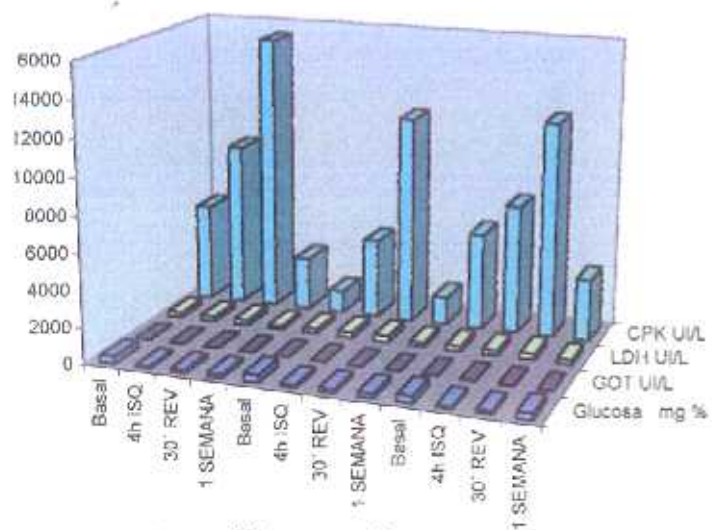


Fig.-32. Tiempo: 4h

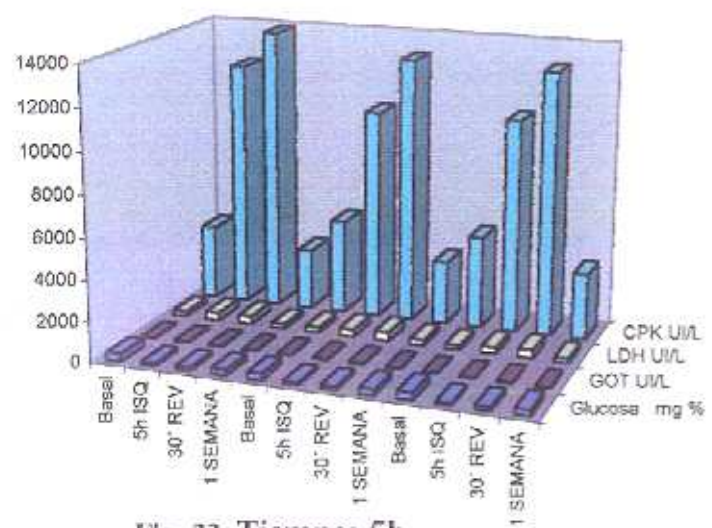


Fig.-33. Tiempo: 5h

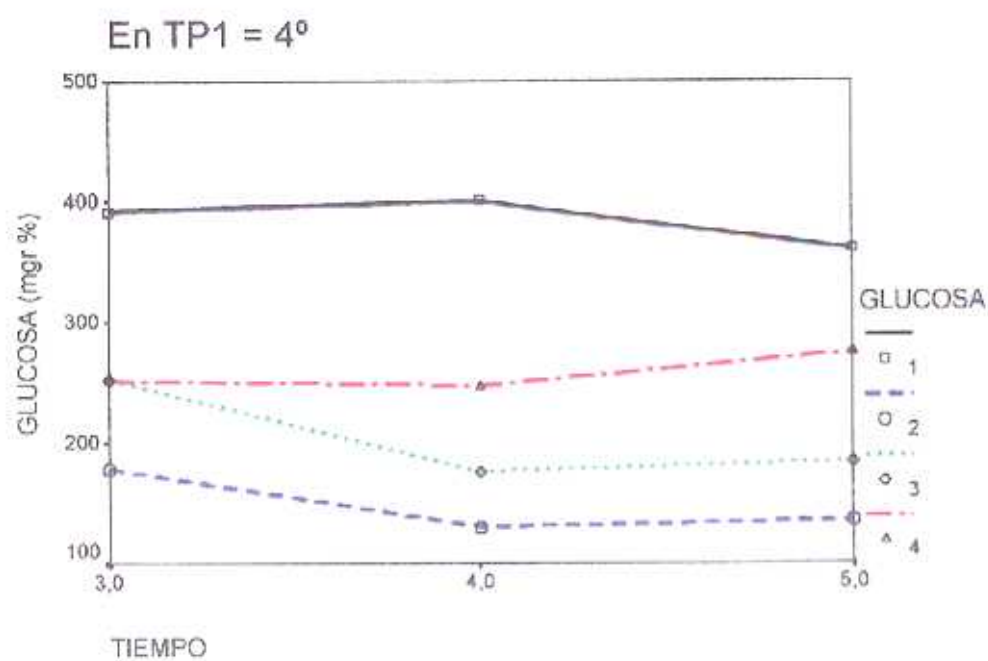


Fig.- 34. Suero a 4°C

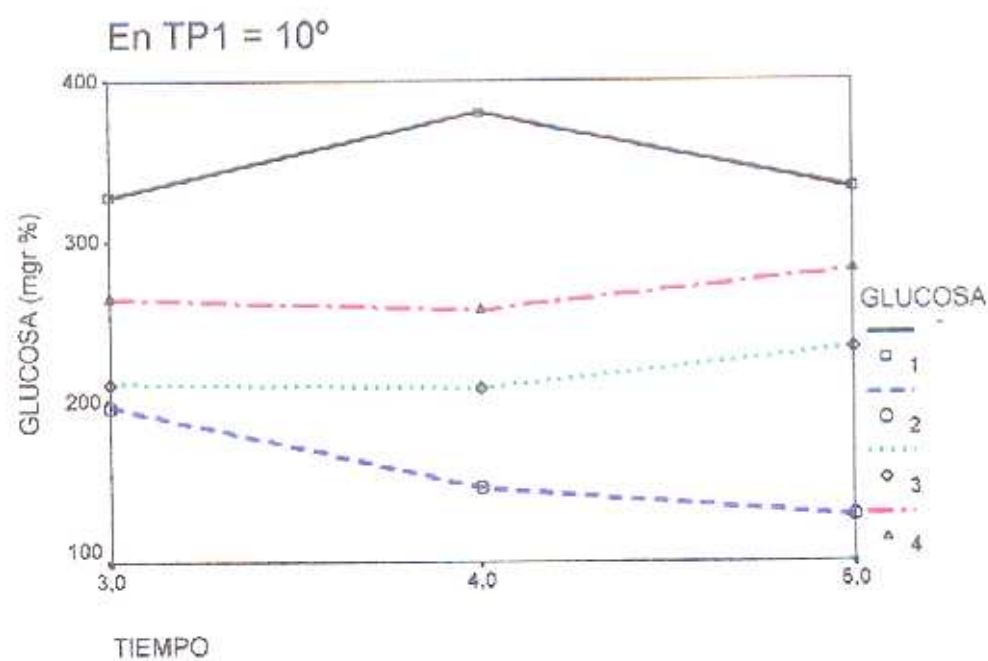


Fig.- 35. Suero a 10°C

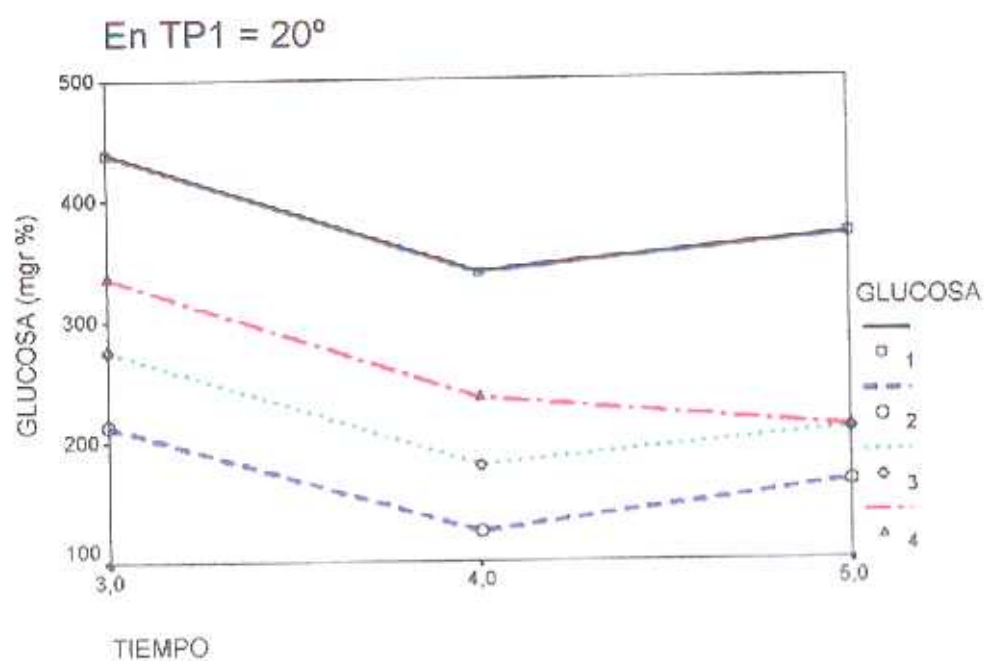


Fig.- 36. Suero a 20°C

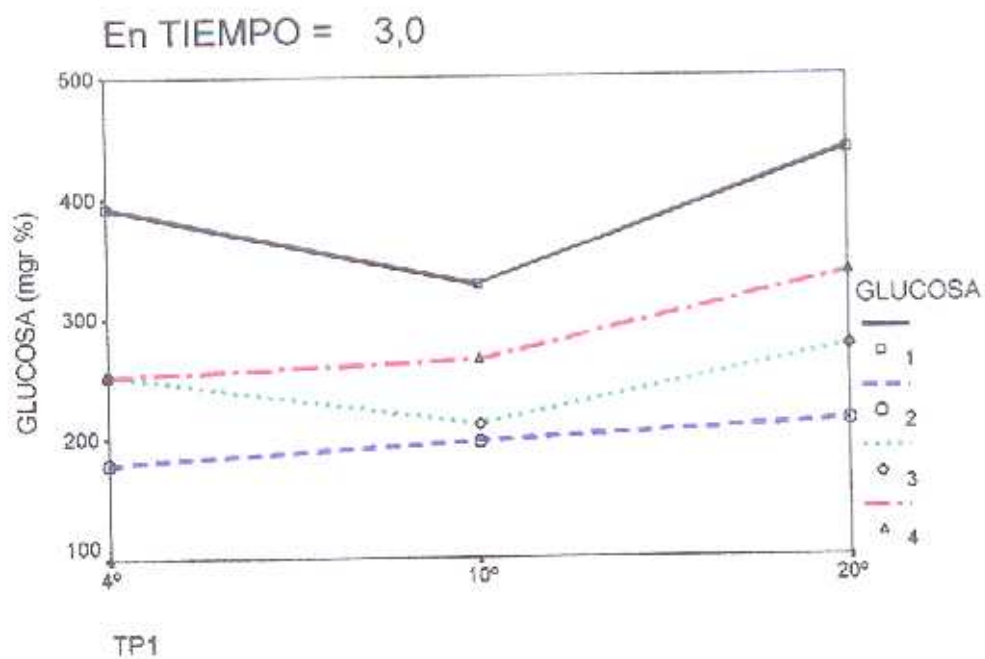


Fig.- 37. Isquemia de 3 h.

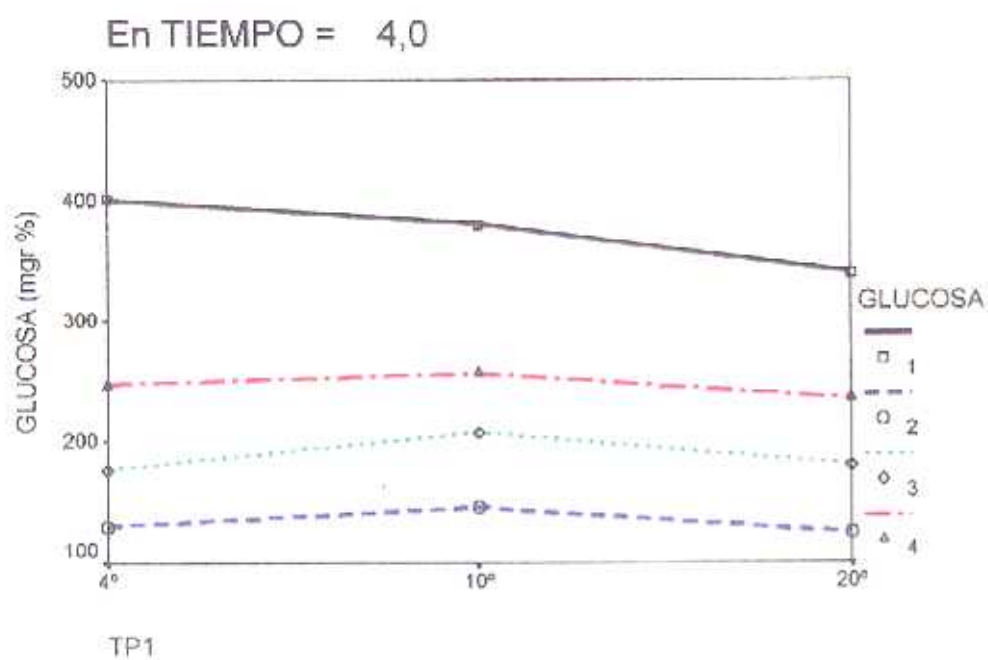


Fig.- 38. Isquemia de 4 h.

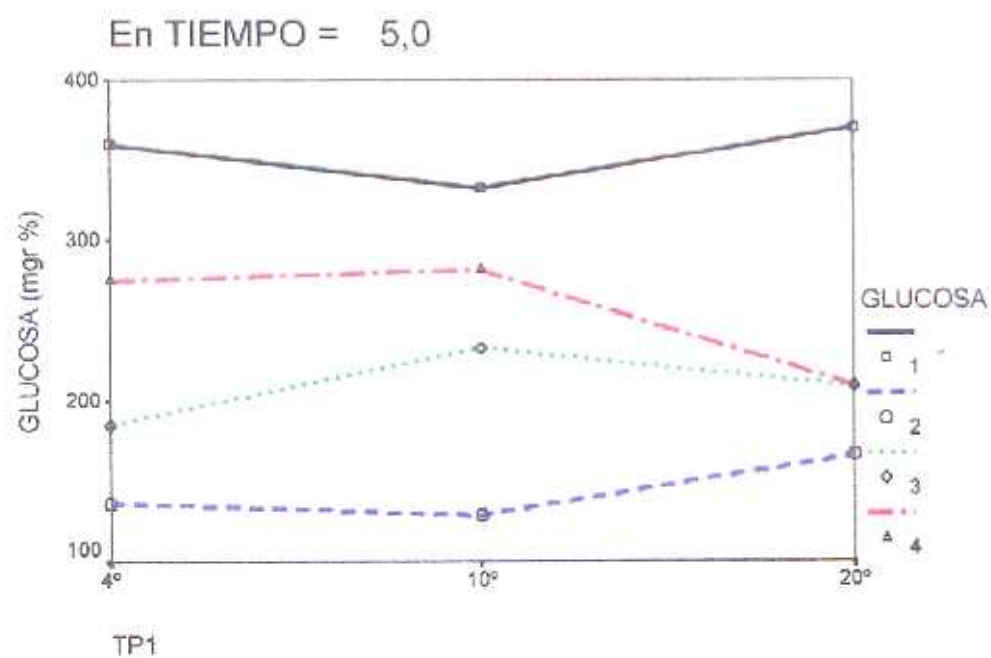


Fig.- 39. Isquemia de 5 h.

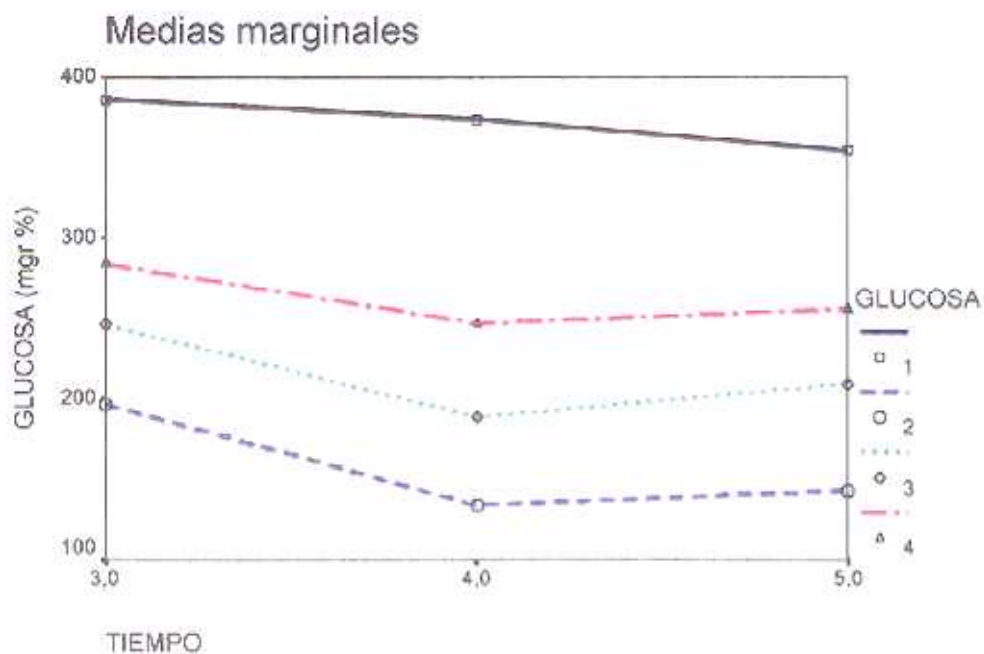


Fig.- 40. Tiempos de isquemia

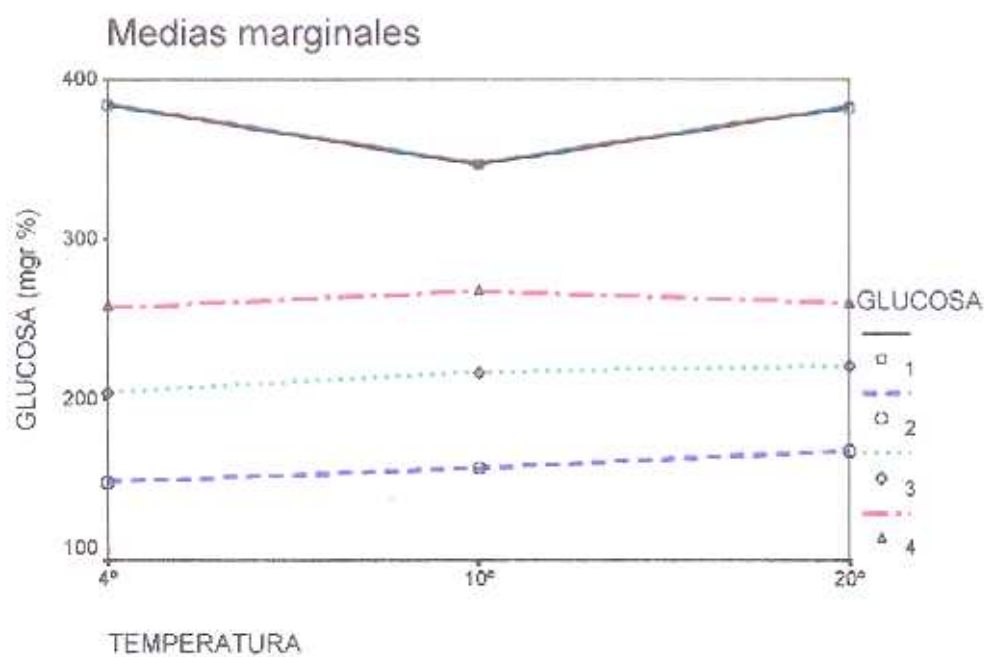


Fig.- 41. Temperaturas de perfusión



TABLA – VIII: Pruebas de efectos intra-sujetos.

Medida:

Esfericidad asumida

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
GLUCOSA	664818,176	3	221606,059	129,594	,000	388,783	1,000
GLUCOSA * TIEMPO	8383,463	6	1397,244	,817	,561	4,903	,295
GLUCOSA * TP1	9152,907	6	1525,485	,892	,507	5,353	,322
GLUCOSA * TIEMPO * TP1	23975,704	12	1997,975	1,168	,329	14,021	,587
Error(GLUCOSA)	92340,000	54	1710,000				

a. Calculado con alfa = ,05

TABLA - IX: Pruebas de los efectos inter-sujetos

Medida:

Variable transformada: Promedio

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
Intercept	1705171,021	1	1705171,021	1237,541	,000	1237,541	1,000
TIEMPO	9672,542	2	4836,271	3,510	,052	7,020	,579
TP1	605,514	2	302,757	,220	,805	,439	,079
TIEMPO * TP1	7485,444	4	1871,361	1,358	,287	5,433	,337
Error	24801,667	18	1377,870				

a. Calculado con alfa = ,05

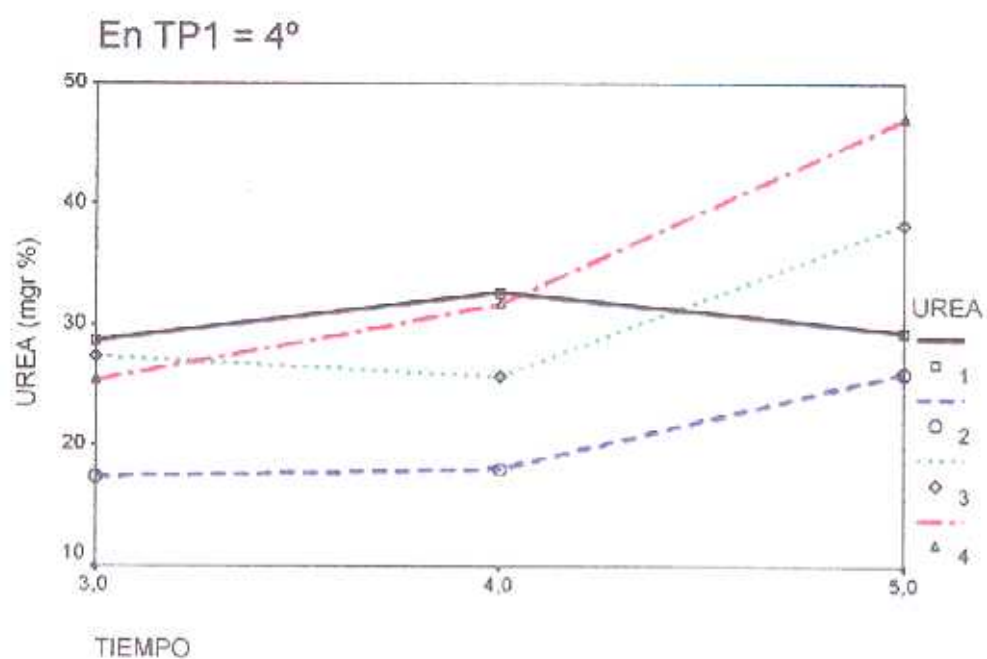


Fig.- 42. Suero a 4°C

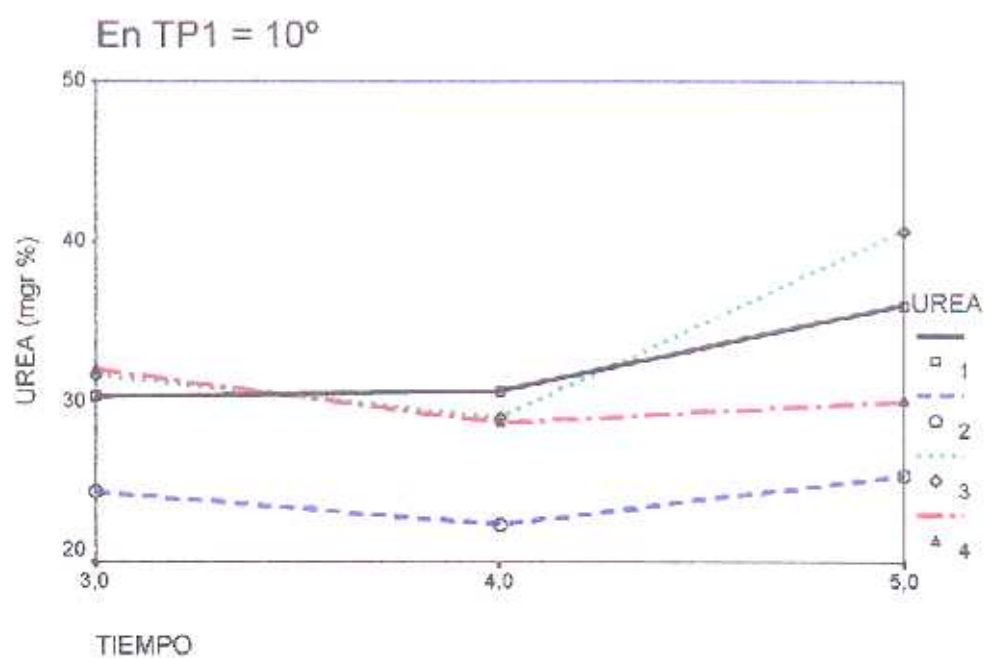


Fig.- 43. Suero a 10°C

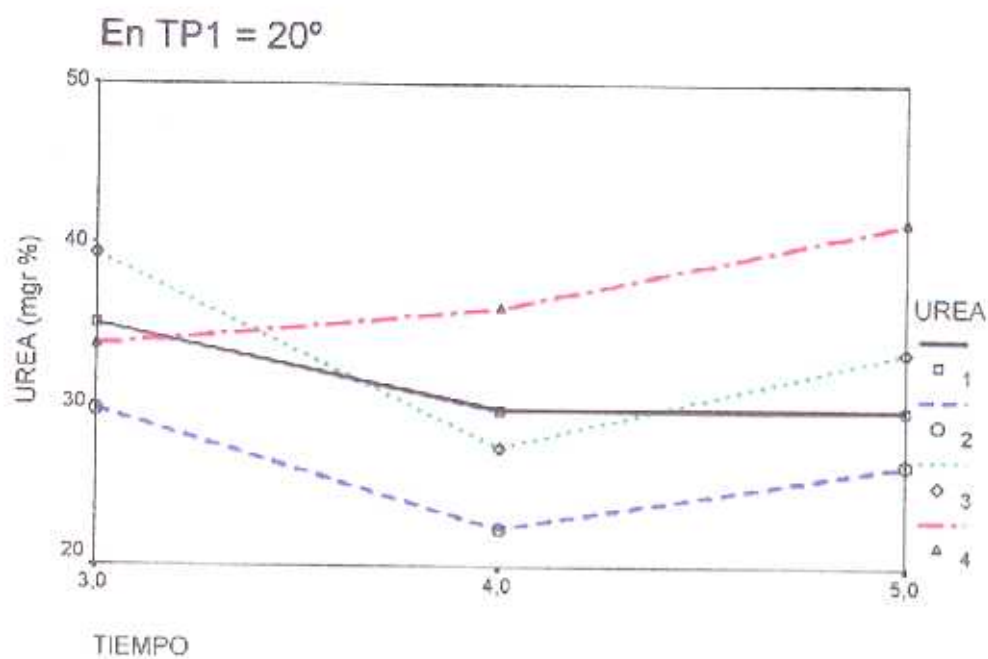


Fig.- 44. Suero a 20°C

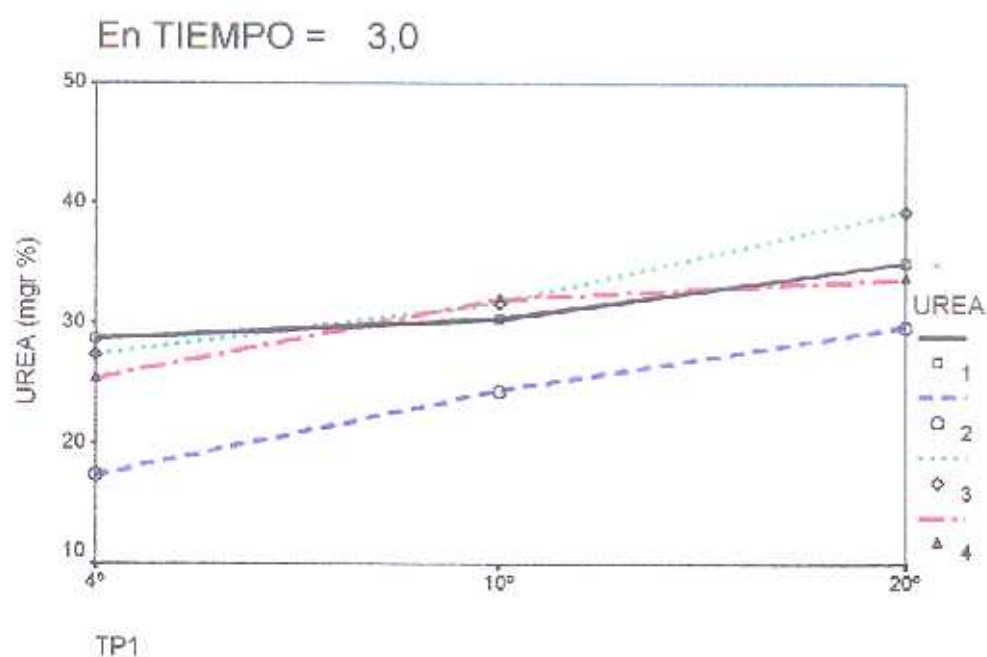


Fig.- 45. Isquemia de 3 h.

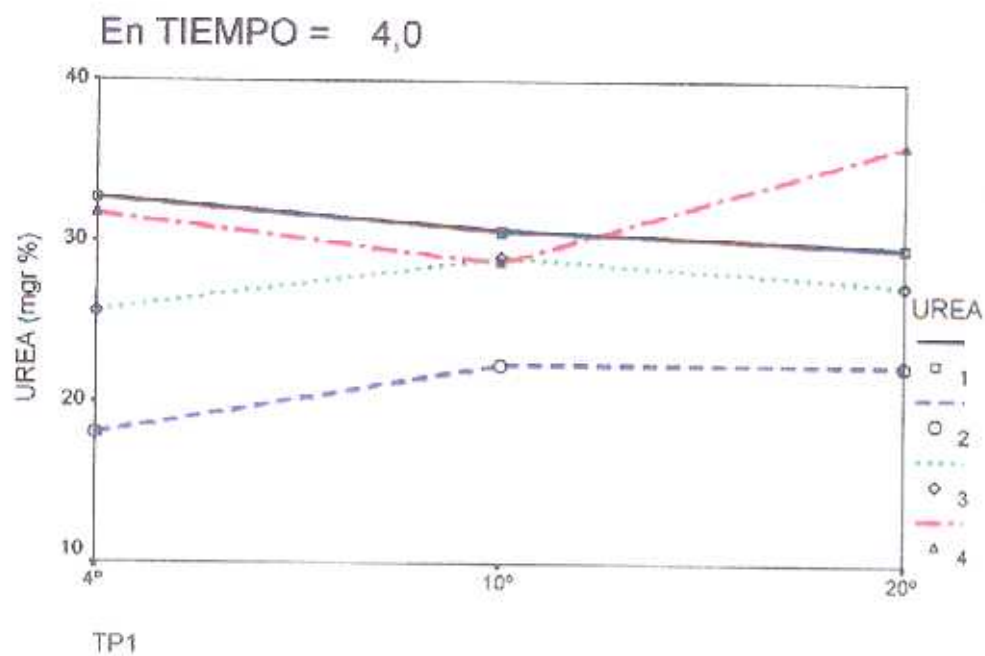


Fig.- 46. Isquemia de 4 h.

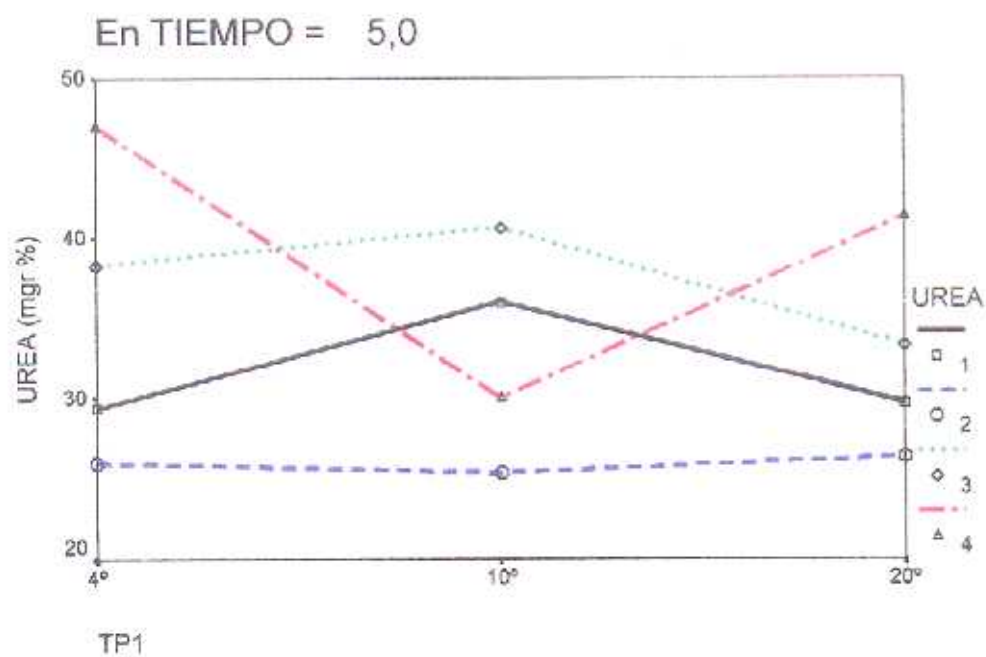


Fig.- 47. Isquemia de 5 h.

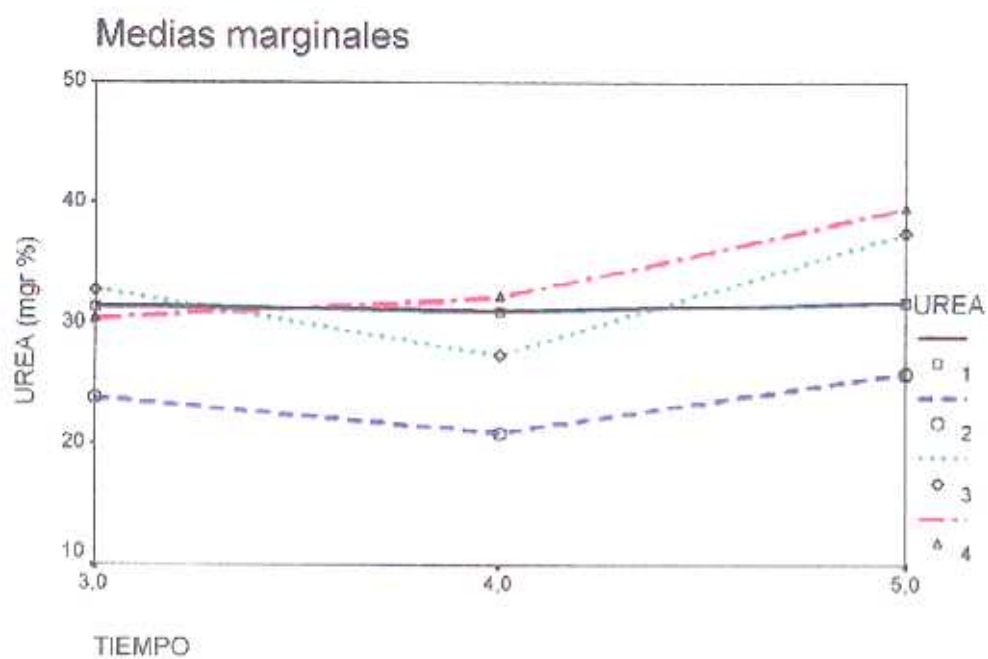


Fig.- 48. Tiempos de Isquemia.

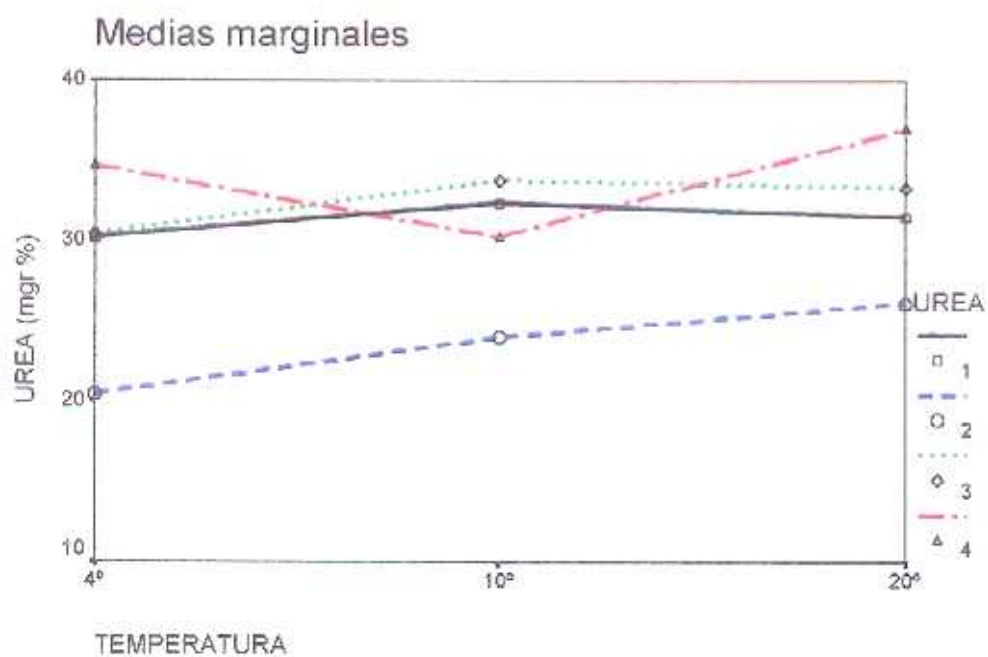


Fig.- 49. Temperaturas de perfusión.

TABLA – X: Pruebas de efectos intra-sujetos.

Medida:

Esfericidad asumida

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
UREA	1765,556	3	588,519	66,858	,000	200,575	1,000
UREA * TIEMPO	362,667	6	60,444	6,867	,000	41,201	,999
UREA * TP1	271,833	6	45,306	5,147	,000	30,881	,989
UREA * TIEMPO * TP1	495,111	12	41,259	4,687	,000	56,247	,999
Error(UREA)	475,333	54	8,802				

a. Calculado con alfa = ,05

TABLA – XI: Pruebas de los efectos inter-sujetos

Medida:

Variable transformada: Promedio

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
Intercept	24843,000	1	24843,000	1014,767	,000	1014,767	1,000
TIEMPO	158,389	2	79,194	3,235	,063	6,470	,542
TP1	42,097	2	21,049	,860	,440	1,720	,175
TIEMPO * TP1	116,722	4	29,181	1,192	,348	4,768	,298
Error	440,667	18	24,481				

a. Calculado con alfa = ,05

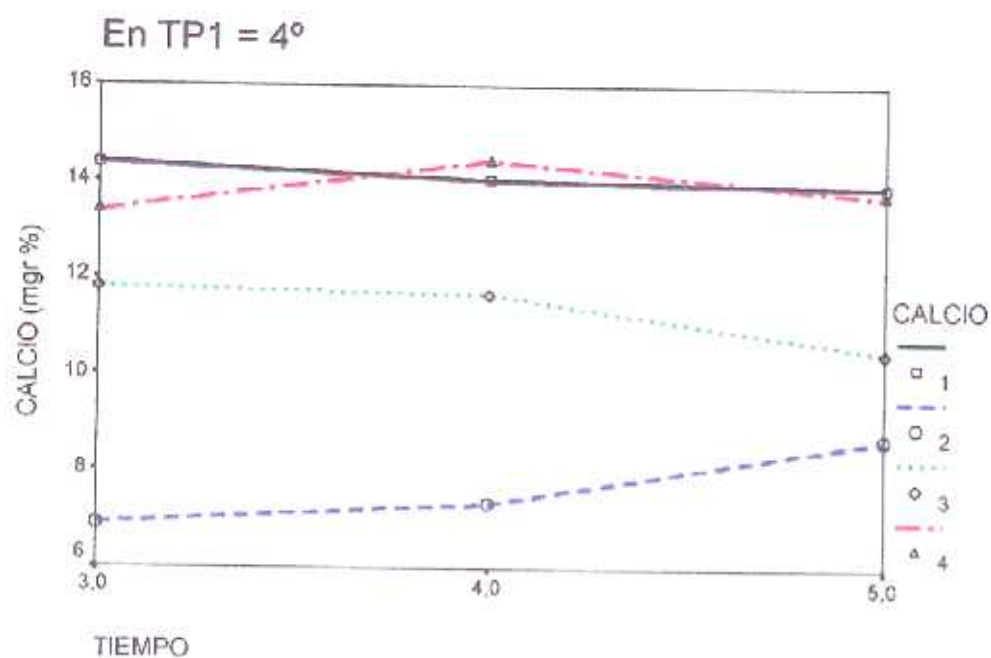


Fig.- 50. Suero a 4°C

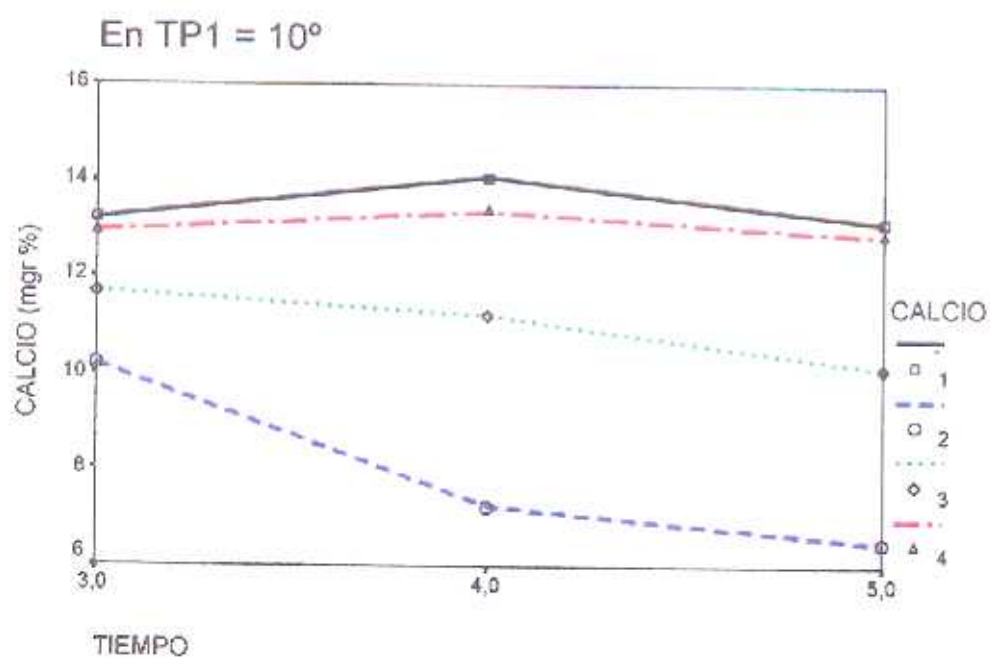


Fig.- 51. Suero a 10°C

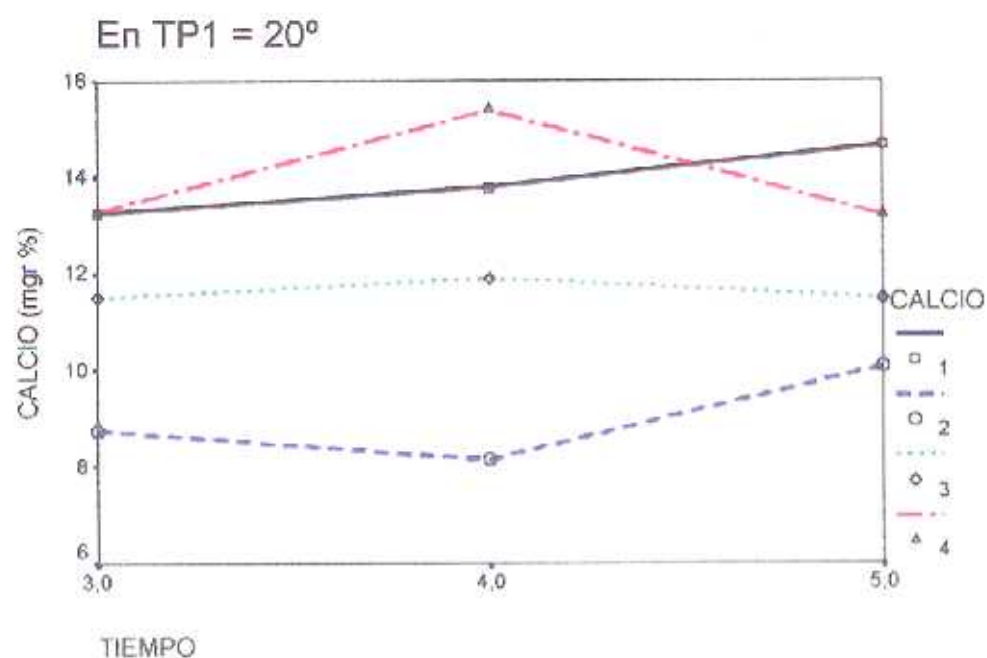


Fig.- 52. Suero a 20°C

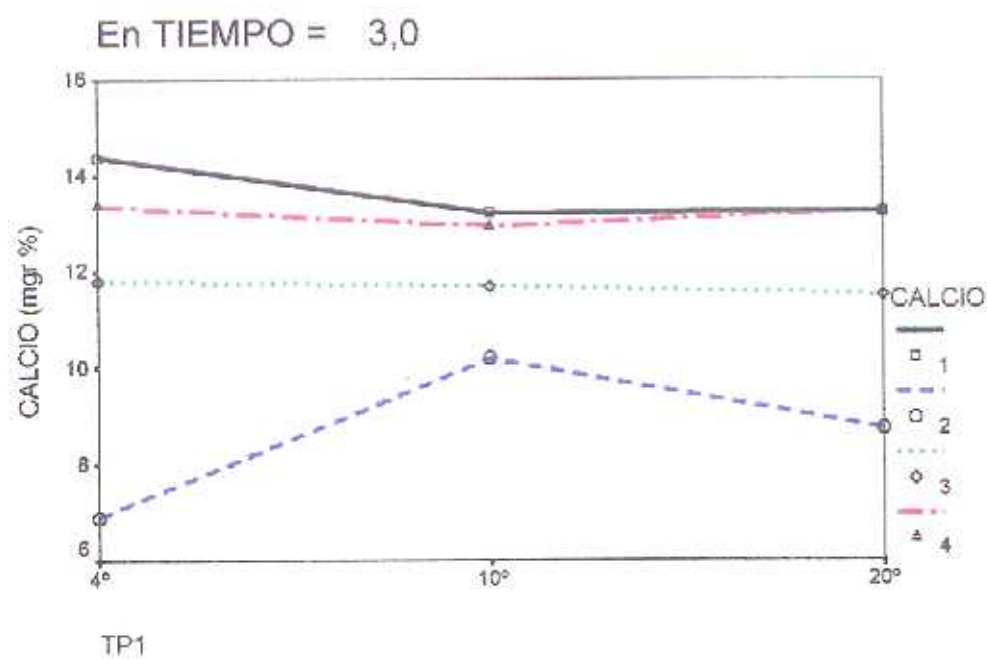


Fig.- 53. Isquemia de 3 h.

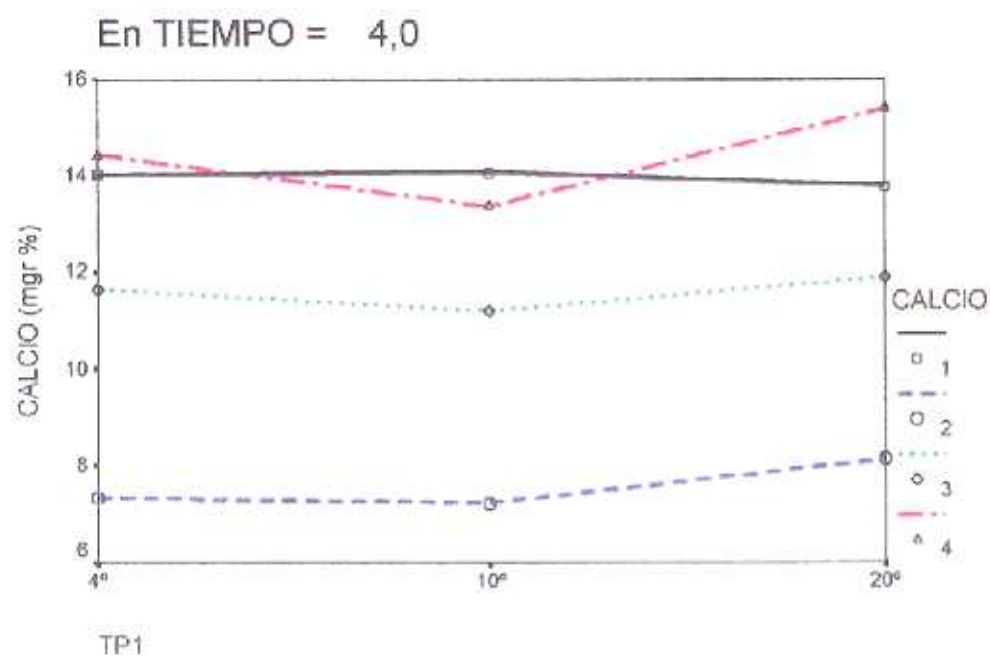


Fig.- 54. Isquemia de 4 h.

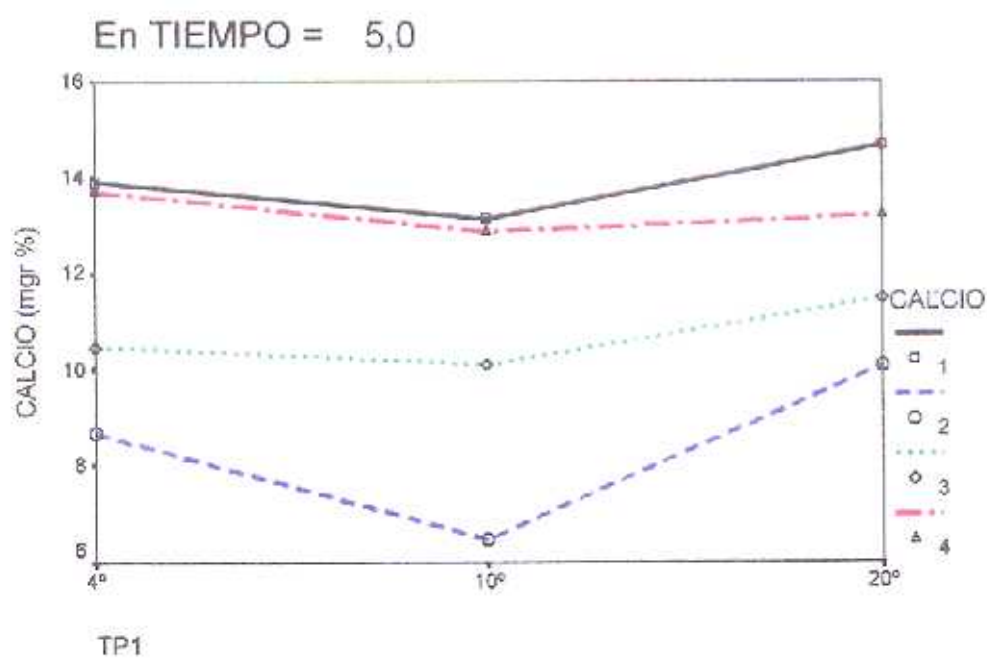


Fig.- 55. Isquemia de 5 h.

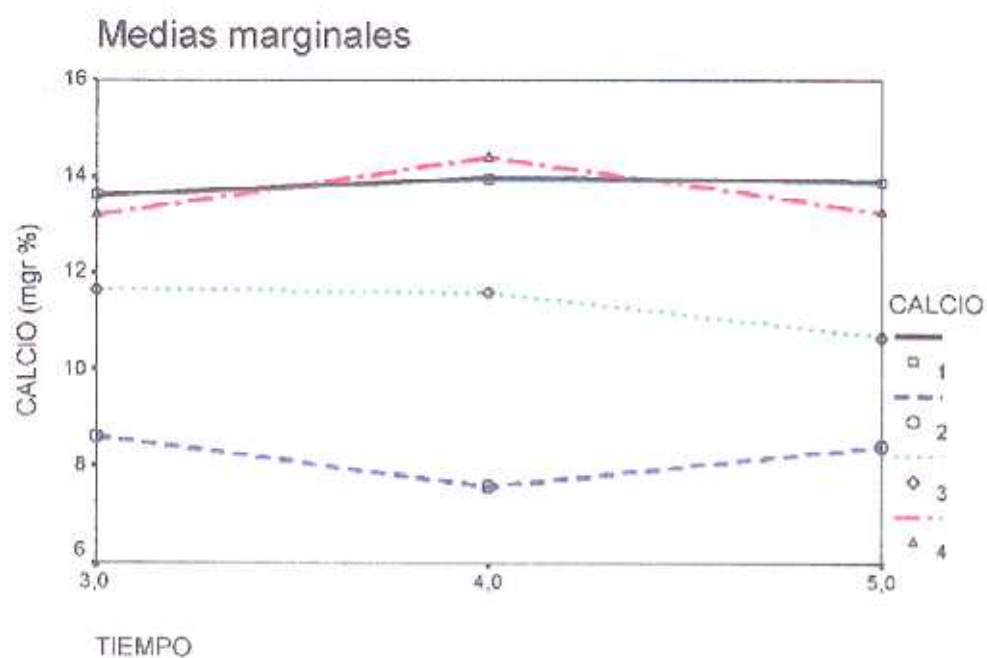


Fig.- 56. Tiempos de ischemia.

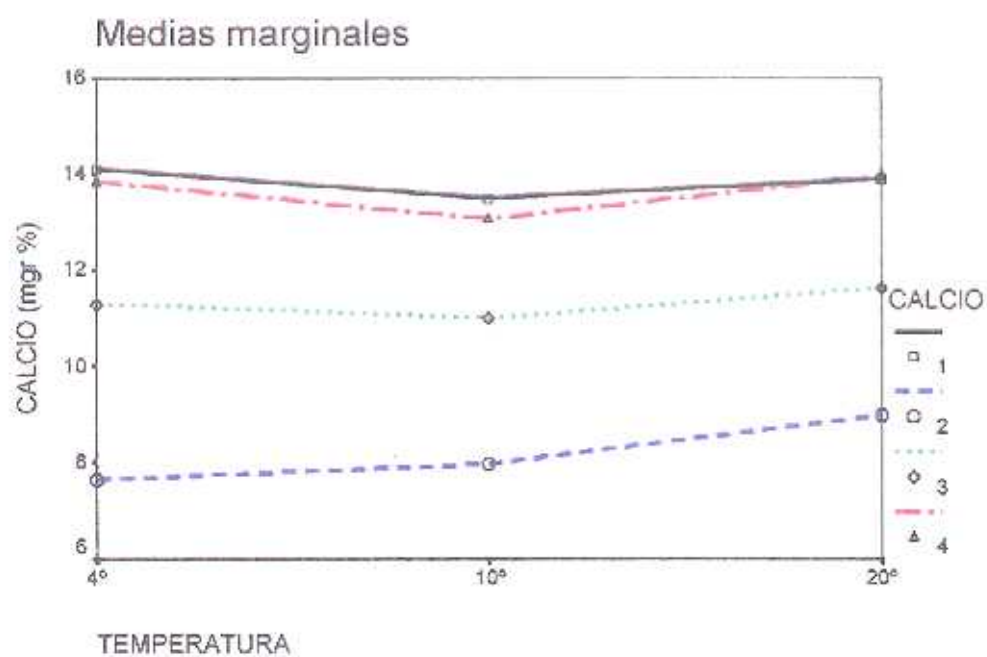


Fig.- 57. Temperaturas de perfusión.

TABLA – XII: Pruebas de efectos intra-sujetos.

Medida:

Esfericidad asumida

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
CALCIO	556,959	3	185,653	421,394	,000	1264,183	1,000
CALCIO * TIEMPO	17,803	6	2,967	6,735	,000	40,408	,999
CALCIO * TP1	6,856	6	1,143	2,594	,028	15,562	,809
CALCIO * TIEMPO * TP1	25,212	12	2,101	4,769	,000	57,225	,999
Error(CALCIO)	23,791	54	,441				

a. Calculado con alfa = ,05

TABLA – XIII: Pruebas de los efectos inter-sujetos

Medida:

Variable transformada: Promedio

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
Intercept	3717,883	1	3717,883	5235,541	,000	5235,541	1,000
TIEMPO	,474	2	,237	,334	,720	,668	,095
TP1	2,462	2	1,231	1,733	,205	3,467	,315
TIEMPO * TP1	3,287	4	,822	1,157	,362	4,629	,290
Error	12,782	18	,710				

a. Calculado con alfa = ,05

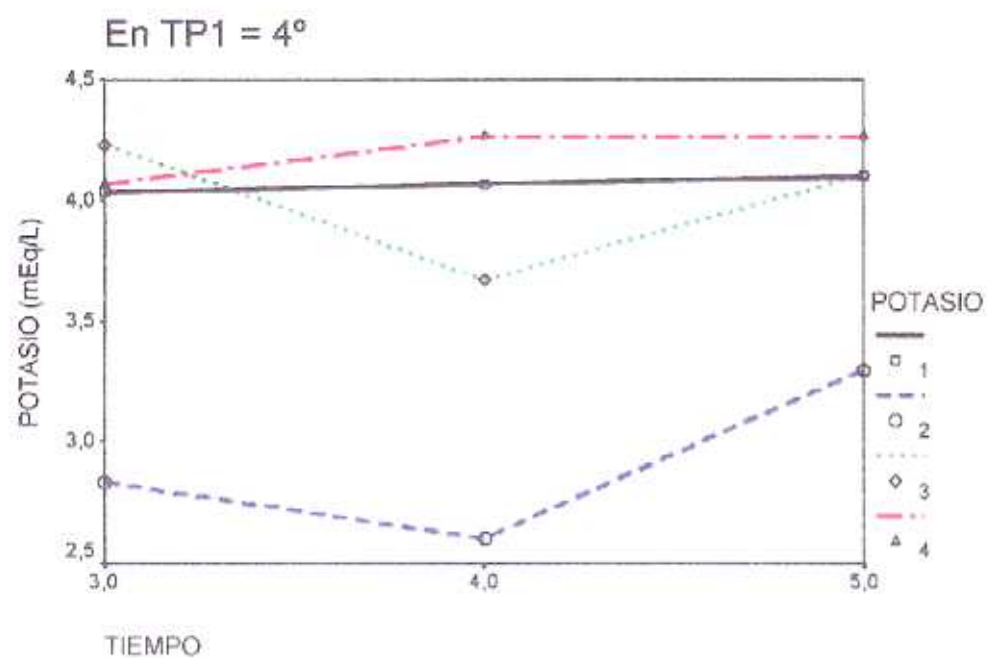


Fig.- 58. Suero a 4°C

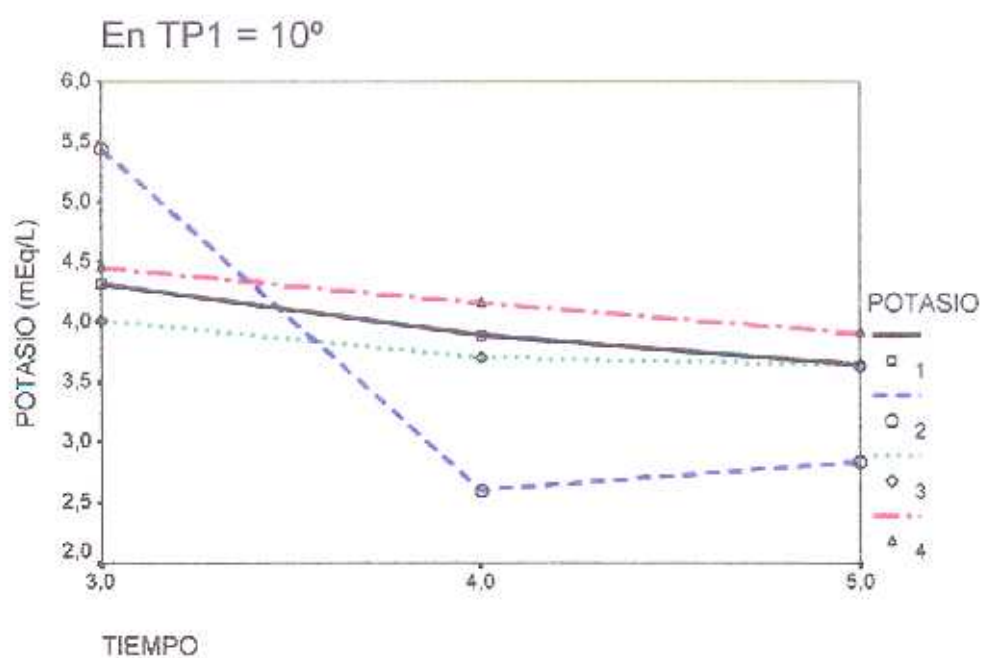


Fig.- 59. Suero a 10°C

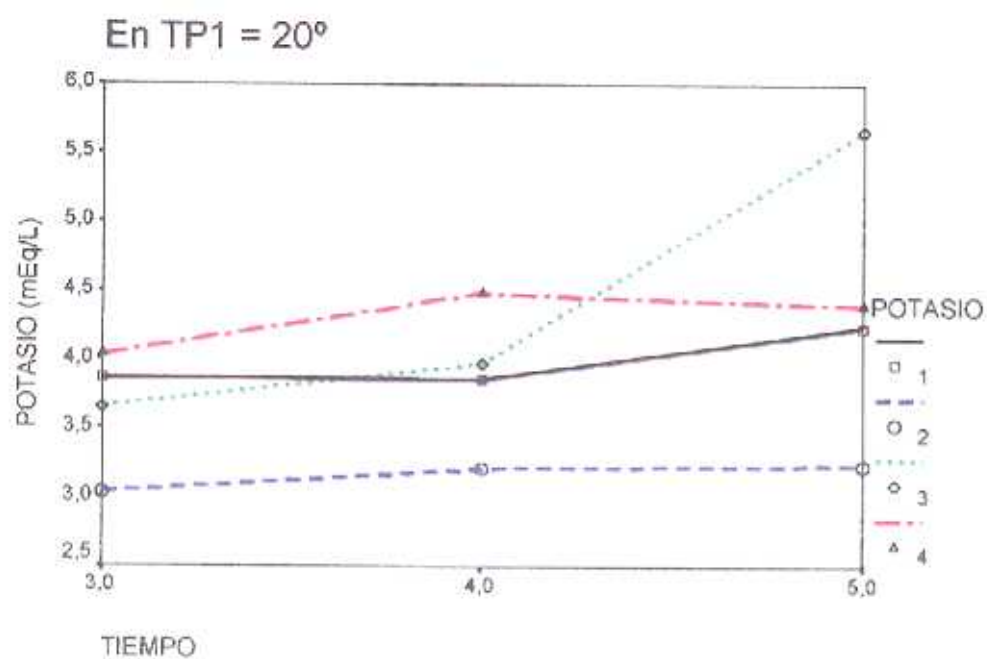


Fig.- 60. Suero a 20°C

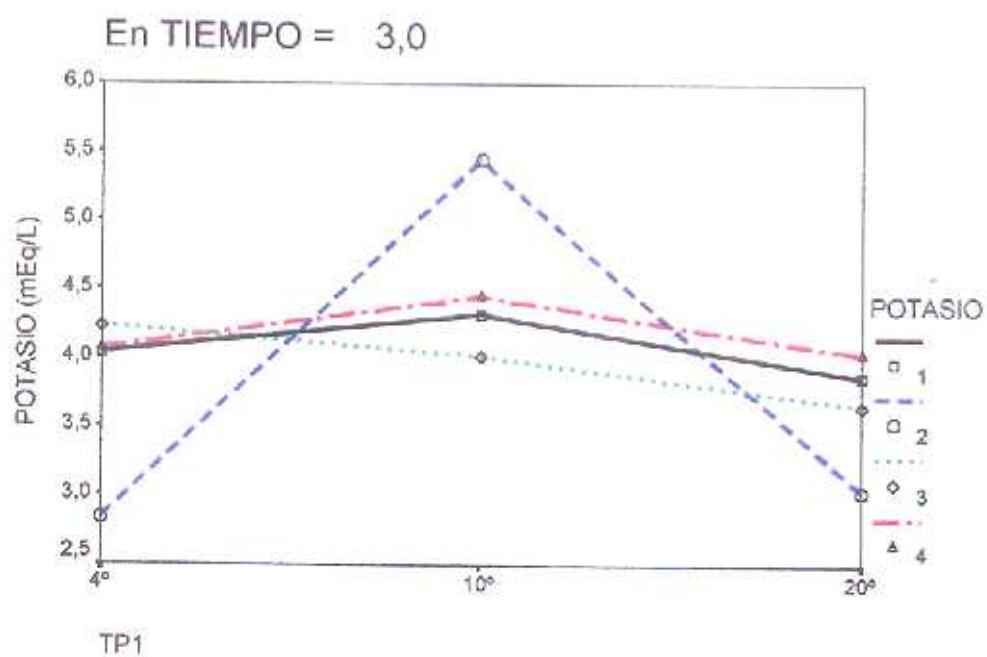


Fig.- 61. Isquemia de 3 h.

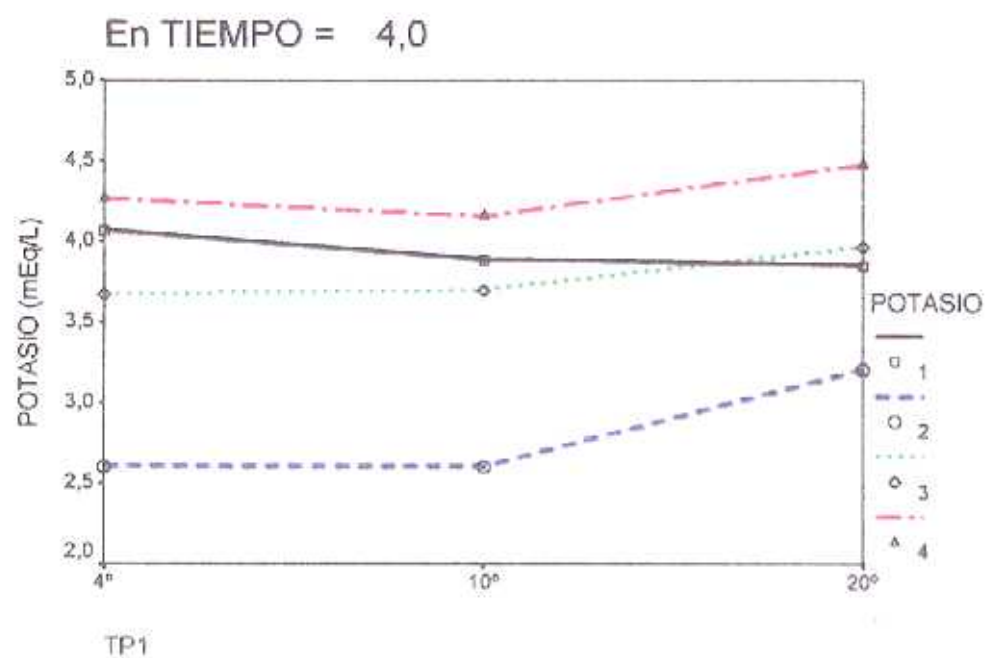


Fig.- 62. Isquemia de 4 h.

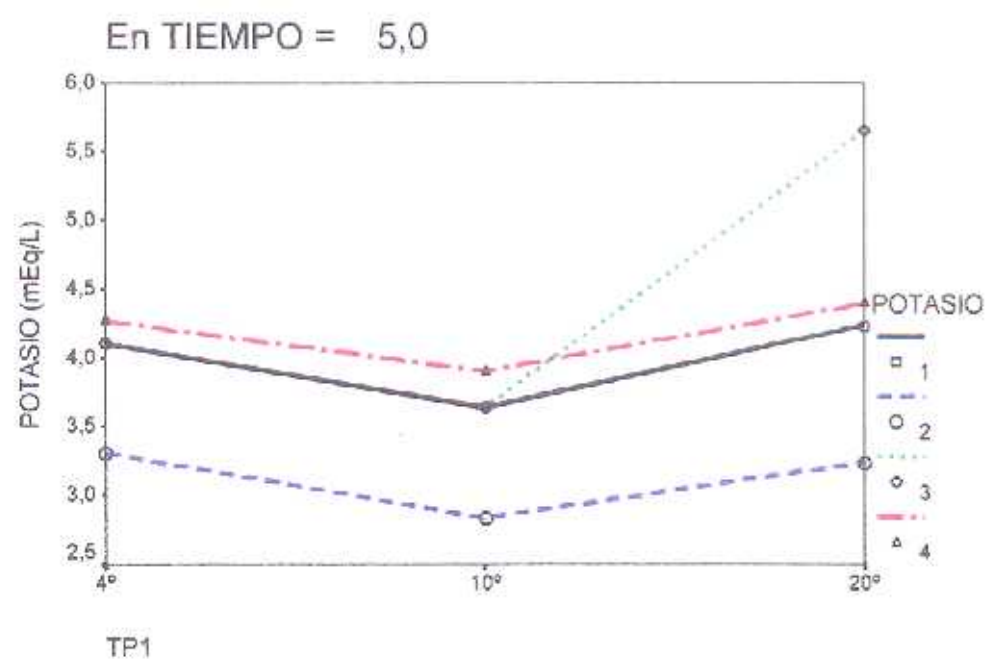


Fig.- 63. Isquemia de 5 h.

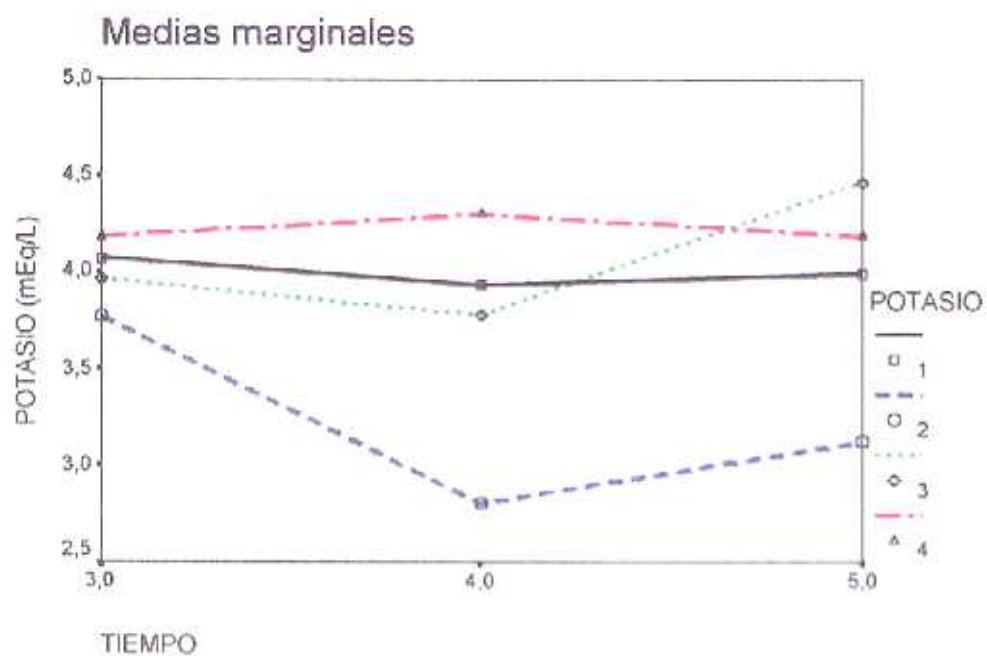


Fig.- 64. Tiempos de isquemia.

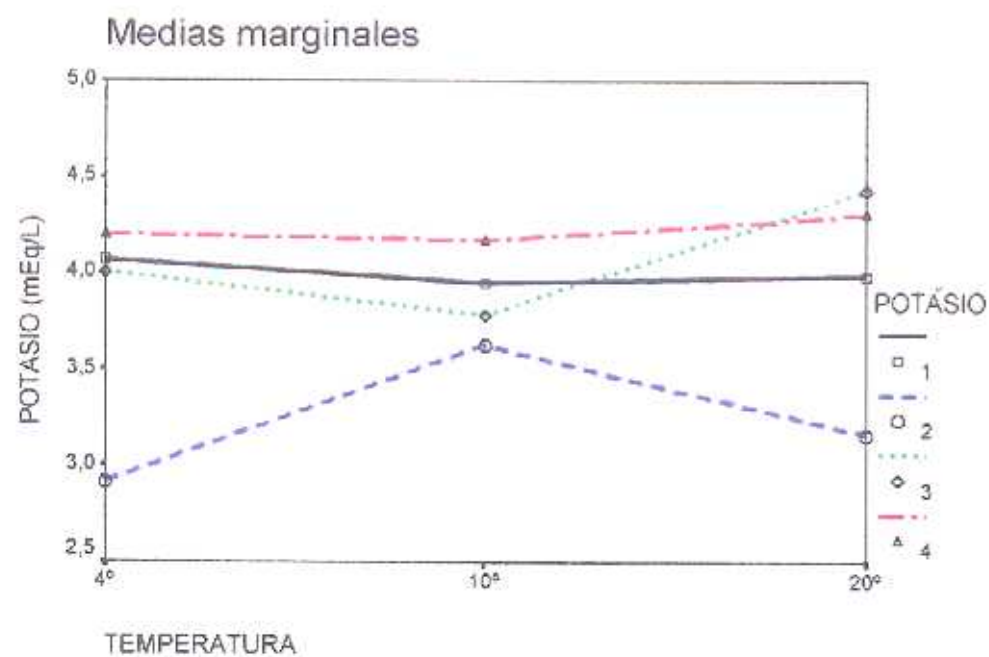


Fig.- 65. Temperaturas de perfusión

TABLA – XIV: Pruebas de efectos intra-sujetos.

Medida:

Esfericidad asumida

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
POTASIO	15,884	3	5,295	7,110	,000	21,330	,974
POTASIO * TIEMPO	5,076	6	,846	1,136	,354	6,817	,409
POTASIO * TP1	3,923	6	,654	,878	,517	5,268	,317
POTASIO * TIEMPO * TP1	8,195	12	,683	,917	,537	11,005	,463
Error(POTASIO)	40,212	54	,745				

a. Calculado con alfa = ,05

TABLA – XV: Pruebas de los efectos inter-sujetos

Medida:

Variable transformada: Promedio

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
Intercept	406,585	1	406,585	871,020	,000	871,020	1,000
TIEMPO	,434	2	,217	,465	,636	,930	,114
TP1	,131	2	6,566E-02	,141	,870	,281	,068
TIEMPO * TP1	2,603	4	,651	1,394	,276	5,576	,346
Error	8,402	18	,467				

a. Calculado con alfa = ,05

La **GOT** basal oscila entre 43 y 14 UI/L, con una media basal total de 22,18 \pm 1,26 UI/L. El valor medio total es de 29,71 \pm 1,19 UI/L, y para la perfusión con suero a 4°C es de 30,5 UI/L, con suero a 10°C de 22,47 UI/L y con suero a 20°C de 36,16 \pm 2,07 UI/L, **Fig.73**.

Con tiempos de isquemia de 3 horas y perfusión con suero a 20°C hay un descenso desde 27,33 \pm 13,57 hasta 22,33 \pm 4,5 UI/L y una elevación postrevascularizar hasta 45,66 \pm 9,29 UI/L, **Fig.25,68 y 69**. Con perfusión a 10°C los valores caen desde 23 \pm 4,35 hasta 21,66 \pm 3,05 UI/L y un ascenso a los 30 minutos de revascularizar hasta 37,66 \pm 5,5 UI/L, **Fig.28,67 y 69**. Con suero a 4°C hay un descenso desde 22,33 \pm 3,05 hasta 17,66 \pm 6,42 UI/L y aumento al revascularizar hasta 37 \pm 6 UI/L, **Fig.31,66 y 69**. A la semana del experimento los valores de GOT descienden con los tres métodos de perfusión, pero con suero a 20°C presenta cifras más elevadas que las basales, 32,33 \pm 3,51 UI/L, **Fig.25 y 69**; con suero a 10°C sus valores están próximos a los basales, 21,33 \pm 4,5 UI/L, **Fig.28 y 69**; con perfusión a 4°C se producen los mayores descensos, muy inferiores a los basales, 15,33 \pm 1,52 UI/L, **Fig.31 y 69**. La isquemia de 4 horas y perfusión a 20°C conlleva una elevación de los valores desde 18 \pm 6,08 hasta 31,66 \pm 4,5 UI/L y posterior aumento al revascularizar, 50,66 \pm 11,5 UI/L, **Fig.26,68 y 70**. Con suero a 10°C se produce una discreta disminución desde 15,33 \pm 1,52 hasta 14,33 \pm 2,3 UI/L y aumento menor a los 30 minutos de la revascularización, 25 \pm 2 UI/L, **Fig.29,67 y 70**. Con suero a 4°C se produce una elevación desde 22,33 \pm 8,5 hasta 28,33 \pm 11,01 UI/L y posterior aumento al revascularizar hasta 37 \pm 11,35 UI/L, **Fig.32,66 y 70**. A la semana de la isquemia todos los valores descienden; la perfusión con suero a 20°C presenta cifras superiores a las basales, 31 \pm 7,55 UI/L, **Fig.26 y 70**; el suero a 10°C tiene una cifra cercana a la basal, con leve caída, 13 \pm 2,64 UI/L, **Fig.29 y 70**; el suero a 4°C presenta cifras inferiores a las basales, 18,33 \pm 4,9 UI/L, **Fig.32 y 70**. La isquemia de 5 horas produce las mayores alteraciones en las cifras de la GOT. Con perfusión a 20°C hay las mayores elevaciones, presentando un ascenso desde 22,66 \pm 7,23 hasta 56,66 \pm 22,81 UI/L y aumento mayor al revascularizar hasta 83,33 \pm 23,71 UI/L, **Fig.27,68 y 71**. Con suero a 10°C hay elevaciones menores, desde 18 \pm 1 UI/L hasta 26 \pm 10,53 UI/L y nuevo aumento al revascularizar hasta 36,33 \pm 12,5 UI/L, **Fig.30,67 y 71**. Con suero a 4°C se aprecian elevaciones intermedias, desde 30,66 \pm 3,05 hasta 39,66 \pm 4,16 UI/L y nueva elevación al revascularizar hasta 64 \pm 3,46 UI/L, **Fig.33,66 y 71**. A la semana, hay una caída de todos los valores. Con suero a 20°C hay unos valores inferiores a los basales,

12,33 \pm 2,08 UI/L, **Fig.27 y 71**; con suero a 10°C se consiguen los valores basales, 18 \pm 2 UI/L, **Fig.30 y 71**; con suero a 4°C persiste una discreta elevación, 33,33 \pm 3,51 UI/L, **Fig.33 y 71**.

Las medias de la GOT, tomadas por tiempos de isquemia y por temperaturas de perfusión, se exponen en las **Fig.72 y 73**.

Considerando el tiempo de isquemia, a las 3 horas se producen las menores alteraciones en los valores de GOT, con variaciones importantes a las 4 horas y muy intensas a las 5 horas, con mayores alteraciones al perfundir con suero a 20°C, **Fig.72**.

La perfusión con suero a 10°C manifiesta las menores variaciones en las cifras de la GOT en todas las mediciones, con una recuperación a la semana con cifras similares a las basales, **Fig.67 y 73**. El suero a 4°C y a 20°C se comportan de manera inversa. Con tiempos de isquemia de 3 y 4 horas, la perfusión con suero a 20°C presenta unos valores a la semana de isquemia más elevados, **Fig.68 y 73**, que con suero a 4°C, **Fig.66 y 73**; sin embargo, a las 5 horas la perfusión con suero a 20°C presenta unos valores a la semana inferiores a la perfusión con suero a 4°C, **Fig.66,68 y 73**.

Tomadas todas las cifras en relación con la temperatura de perfusión observamos que las cifras totales a la semana están próximas a las cifras basales, con leve disminución con suero a 4°C y ligero aumento con suero a 20°C, **Fig.73**.

Mediante el análisis estadístico apreciamos que hay un nivel de relación muy significativo ($p < 0,001$) con respecto al tiempo de isquemia, respecto a la temperatura de perfusión y la relación entre el momento de la medición, el tiempo de isquemia y la temperatura de perfusión, **Tabla XVI y XVII**.

La LDH basal oscila entre 334 y 109 UI/L, con una basal media total de 218,29 \pm 7,95 UI/L. El valor medio total es de 262,25 \pm 11,75 UI/L, y para la perfusión a 4°C es de 263,47 UI/L, con suero a 10°C es de 226,61 UI/L y para sueros a 20°C es de 296,69 \pm 20,36 UI/L, **Fig.81**.

Con tiempos de isquemia de 3 horas y perfusión a 20°C se observa un aumento de las cifras desde 257,66 \pm 83,79 hasta 280,66 \pm 68,41 UI/L, con aumento postrevascularización hasta 346,33 \pm 36,63 UI/L, **Fig.25,76 y 77**. Con suero a 10°C se produce una elevación más moderada en sus cifras, desde 206 \pm 35 hasta 218 \pm 17,57 UI/L, y nuevo ascenso a los 30 minutos de la revascularización hasta 296 \pm 19,97 UI/L, **Fig.28,75 y 77**. Al perfundir con suero a 4°C se produce una disminución de sus valores al finalizar el tiempo de isquemia, desde 193,66 \pm 10,01 hasta 166,66 \pm 20,74 UI/L, con el

ascenso más importante postrevascularización, hasta $346 \pm 90,07$ UI/L, **Fig.31,74 y 77**. A la semana de la isquemia, con suero a 20°C persiste la elevación, similar a las cifras obtenidas después de la revascularización, $346 \pm 204,22$ UI/L, **Fig.25,76 y 77**. Con suero a 10°C se obtiene un valor cercano al basal, con leve disminución, $181,33 \pm 30,98$ UI/L, **Fig.28,75 y 77**. Y la perfusión a 4°C presenta un descenso importante de sus valores, $131 \pm 16,82$ UI/L, **Fig.31,74 y 77**. La isquemia de 4 horas con una perfusión a 20°C produce un aumento de los valores desde $201 \pm 39,96$ hasta $243 \pm 97,92$ UI/L y un aumento posterior al revascularizar hasta $375,66 \pm 180,14$ UI/L, **Fig.26,76 y 78**. Con suero a 10°C se producen menores ascensos de los valores de LDH, desde $145,66 \pm 52,65$ hasta $161,66 \pm 55,98$ UI/L y nueva elevación después de la revascularización hasta $242,66 \pm 67,41$ UI/L, **Fig.29,75 y 78**. Y al perfundir con suero a 4°C se producen aumentos más moderados que con el suero a 20°C , desde $266,66 \pm 11,01$ hasta $285,33 \pm 9,29$ UI/L, con nuevo aumento al revascularizar hasta $343 \pm 25,63$ UI/L, **Fig.32,74 y 78**. A la semana del experimento, los animales perfundidos con suero a 20°C presentan unas cifras aún mayores que al revascularizar, $408,66 \pm 243,06$ UI/L, **Fig.26 y 76**. Los que han sido perfundidos con suero a 10°C tienen unos valores cercanos a los basales, con una pequeña disminución, $131,66 \pm 37,58$ UI/L, **Fig.29 y 75**. Y con suero a 4°C las cifras obtenidas son inferiores a las basales, $209,66 \pm 30,66$ UI/L, **Fig.32 y 74**. Los tiempos de isquemia de 5 horas producen las mayores alteraciones en los valores de la LDH. Con perfusión a 20°C hay un aumento desde $255,66 \pm 31,94$ hasta $347,66 \pm 53,3$ UI/L y un nuevo aumento al revascularizar, pero menor que con los otros métodos, hasta $391 \pm 23,81$ UI/L, **Fig. 27,76 y 79**. Con perfusión a 10°C hay un aumento desde $201,66 \pm 33,2$ hasta $305,66 \pm 48,56$ UI/L, presentando las cifras más elevadas después de revascularizar, hasta $439,33 \pm 39,87$ UI/L, **Fig.30,75 y 79**. La perfusión con suero a 4°C presenta la mayor elevación al finalizar el tiempo de isquemia, desde $236,66 \pm 22,18$ hasta $354 \pm 36,86$ UI/L, con elevación posterior al revascularizar menor que con suero a 10°C , $412 \pm 17,34$ UI/L, **Fig.33,74 y 79**. A la semana del experimento se produce una disminución de todos los valores, por debajo de las cifras basales, con los tres métodos de perfusión. Con suero a 20°C se observa el mayor descenso, hasta 107 ± 18 UI/L, **Fig.27 y 76**. Con suero a 10°C hay una cifra próxima a la basal, $189,66 \pm 33,23$ UI/L, **Fig.30 y 75**. Con el suero a 4°C hay una caída algo superior a la perfusión con suero a 10°C , pero con cifras cercanas a la basal, $217 \pm 29,59$ UI/L, **Fig.33 y 74**.

Las medias de la LDH, tomadas por tiempos de isquemia y por temperaturas de perfusión, se exponen en las **Fig.80 y 81**.

Si consideramos el tiempo de isquemia, a las 3 horas se producen las menores alteraciones de la LDH, con cifras similares a las basales a la semana del experimento; con 4 y 5 horas hay mayores alteraciones, presentando cifras superiores a las basales con 4 horas y cifras inferiores a las 5 horas de isquemia, **Fig.80**.

Tomados todos los valores en relación a la temperatura de perfusión observamos que la perfusión con suero a 10°C presenta cifras cercanas a las basales a la semana del experimento, siendo algo inferiores para la perfusión con suero a 4°C y superiores con suero a 20°C, **Fig.81**.

La perfusión con suero a 10°C produce las menores oscilaciones en los valores de LDH, excepto en periodos de 5 horas de isquemia en donde presenta una gran elevación a los 30 minutos de revascularizar, pero volviendo a las cifras basales a la semana, **Fig.75 y 81**. Los sueros a 4°C y 20°C se comportan de manera inversa; con tiempos de isquemia de 3 y 4 horas y perfusión a 20°C los valores obtenidos de LDH están elevados a la semana, estando por debajo del nivel basal con 5 horas de isquemia, **Fig.76 y 80**; si la perfusión es con suero a 4°C, con isquemias de 3 y 4 horas sus cifras, tomadas a la semana, son inferiores a las basales, pero se aproximan a ellas, y con valores más bajos en isquemias de 5 horas, **Fig.74 y 80**.

El análisis estadístico muestra con las variables intra-sujetos un nivel de relación muy significativo ($p<0,001$) para el momento de la medición, el tiempo de isquemia y la relación entre el momento, el tiempo de isquemia y la temperatura, y con las variables inter-sujetos hay una relación casi significativa ($p<0,07$) para la temperatura de perfusión, **Tabla XVIII y XIX**.

La CPK basal oscila entre 5725 y 1205 UI/L, con una media basal total de 3664,11 \pm 256,77 UI/L. El valor medio total es de 6242,18 \pm 378,76 UI/L, y para la perfusión con suero a 4°C es de 6985,8 UI/L, con suero a 10°C es de 5223,38 UI/L y con suero a 20°C es de 6515,36 \pm 656,03 UI/L, **Fig.89**.

Cuando se somete al animal de experimentación a 3 horas de isquemia y perfusión a 20°C observamos un aumento de los valores desde 4473,66 \pm 1205,9 hasta 6101 \pm 1626,06 UI/L, con un nuevo aumento a los 30 minutos de revascularizar hasta 8859,33 \pm 950,18 UI/L, **Fig.25,84 y 85**. La perfusión con suero a 10°C produce las menores elevaciones, siendo desde 2532,66 \pm 1393,72 hasta 4430,66 \pm

3021,85 UI/L, elevándose de nuevo al revascularizar hasta 7308,33 \pm 4323,61 UI/L, **Fig.28,83 y 85**. Al perfundir con suero a 4°C se produce un aumento desde 4114,33 \pm 1706,32 hasta 4922 \pm 2028,28 UI/L, y al revascularizar se producen las mayores elevaciones de la CPK, hasta 13162,33 \pm 2350,62 UI/L, **Fig.31,82 y 85**. A la semana, los tres grupos presentan cifras próximas a las basales. Con suero a 20°C hay unos valores de 4526,33 \pm 1064,02 UI/L, algo por encima de la basal, **Fig.25,84 y 85**; con suero a 10°C presenta 2495,66 \pm 907,06 UI/L, superpuesta a la basal, **Fig.28,83 y 85**, y con suero a 4°C obtenemos 3787,66 \pm 3313,38 UI/L, por debajo de la cifra basal, **Fig.31,82 y 85**. Con tiempos de isquemia de 4 horas y perfusión con suero a 20°C hay una elevación desde 3055,33 \pm 1135,77 hasta 8902,66 \pm 7286,77 UI/L, con elevación posterior a los 30 minutos de revascularizar hasta 10976,66 \pm 7848,62 UI/L, **Fig.26,84 y 86**. Con suero a 10°C se producen las menores elevaciones de CPK, desde 2595,33 \pm 692,03 hasta 4616,33 \pm 225,7 UI/L, con aumento postrevascularización hasta 7896,66 \pm 570,02 UI/L, **Fig.29,83 y 86**. El suero a 4°C induce un aumento de los valores desde 3980,66 \pm 2404,24 hasta 6818 \pm 2349,83 UI/L, con el mayor aumento posterior a la revascularización, hasta 13162,33 \pm 2350,62 UI/L, **Fig.32,82 y 86**. A la semana del experimento la perfusión con suero a 10°C y 20°C disminuyen sus cifras hasta valores basales; con suero a 20°C hay un valor superponible al basal, de 3053,33 \pm 1533,26 UI/L, **Fig.26,84 y 86**; y con suero a 10°C hay un valor algo menor al basal, de 2321 \pm 668,81 UI/L, **Fig.29,83 y 86**. El suero a 4°C, a la semana, presenta unos valores muy por debajo de los iniciales, de 2618,66 \pm 969,01 UI/L, **Fig.32,82 y 86**. Los tiempos de isquemia de 5 horas producen las mayores alteraciones en los valores de la CPK. Con perfusión a 20°C se produce un aumento desde 3991,33 \pm 1320,78 hasta 9302,33 \pm 263,05 UI/L, con aumento a los 30 minutos de revascularizar hasta 13389,33 \pm 817,72 UI/L, **Fig.27,84 y 87**. Con suero a 10°C se observa una elevación desde 3958 \pm 367,75 hasta 7573,33 \pm 2151,15 UI/L y la mayor elevación es posterior a la revascularización, hasta 13598,33 \pm 2128,01 UI/L, **Fig.30,83 y 87**. El suero a 4°C produce el mayor aumento de los valores al finalizar el tiempo de isquemia, desde 4275,66 \pm 532,93 hasta 10943,33 \pm 1004,5 UI/L y una menor elevación posterior a la revascularización, hasta 13248,33 \pm 549,74 UI/L, **Fig.33,82 y 87**. A la semana del experimento hay una disminución de todos los valores, inferiores a las cifras basales. Con suero a 20°C se aprecia el valor más bajo de todos, de 1577 \pm 675,88 UI/L, **Fig.27,84 y 87**. Con suero a 10°C hay una menor disminución de los valores, estando cercanos a los

basales, presentando 3354,33 +/- 181,38 UI/L, **Fig.30,83 y 87**. Con suero a 4°C sus valores son inferiores a los basales, siendo de 3125,33 +/- 132,93 UI/L, **Fig.33,82 y 87**.

Las medias de la CPK, tomadas por tiempos de isquemia y por temperaturas de perfusión, se describen en las **Fig.88 y 89**.

Teniendo en cuenta el tiempo de isquemia, a las 3 horas se producen las menores alteraciones y una recuperación de los valores basales a la semana de la isquemia, **Fig.85 y 88**; los tiempos de 4 horas producen mayores variaciones, con recuperación de las cifras basales a la semana al perfundir con suero a 10°C y 20°C, **Fig.86 y 88**. La isquemia de 5 horas produce los mayores cambios en los valores de la CPK, presentando a la semana unos valores inferiores, pero cercanos a los basales, al perfundir con suero a 10°C y 4°C, **Fig.87 y 88**.

Tomados en conjunto los tres métodos de perfusión observamos como la perfusión con suero a 10°C presenta las menores alteraciones y una recuperación a la semana muy próxima a los valores basales, teniendo un comportamiento muy parecido la utilización de suero a 20°C y a 4°C, con valores superiores durante la isquemia y revascularización y mayor descenso a la semana del experimento, **Fig.89**.

La perfusión con suero a 10°C produce las menores variaciones en los valores de CPK, excepto a los 30 minutos de revascularizar en periodos de isquemia de 5 horas, en donde presenta la máxima elevación, pero decrece y recupera unos valores cercanos a los basales a la semana, **Fig.83 y 89**. Los sueros a 4°C y 20°C actúan de manera parecida; la perfusión con suero a 20°C durante tiempos de isquemia de 3 y 4 horas presenta ascensos importantes posteriores a la revascularización, pero sus valores a la semana del experimento están próximos o se superponen a los basales, y con 5 horas de isquemia, después de una gran elevación al revascularizar, sus cifras descienden, para presentar a la semana unos valores muy inferiores a los basales, **Fig.84 y 89**; si la perfusión es con suero a 4°C, sus valores ascienden tras la revascularización para caer a continuación y presentar unas cifras inferiores a las iniciales con los tres periodos de isquemia, más acusado con isquemias de 4 horas, **Fig.82 y 89**.

En el análisis estadístico comprobamos como en las variables intra-sujetos hay un nivel de relación muy significativo ($p<0,001$) para el momento de la medición y el tiempo de isquemia, siendo significativo ($p<0,05$) con respecto a la temperatura, **Tabla XX y XXI**. Con los contrastes multivariados

existe una relación estadística muy significativa ($p < 0,001$) respecto al momento de la toma y la temperatura de perfusión, así como con la relación existente entre el momento, el tiempo y la temperatura, siendo significativo ($p < 0,01$) para el tiempo.

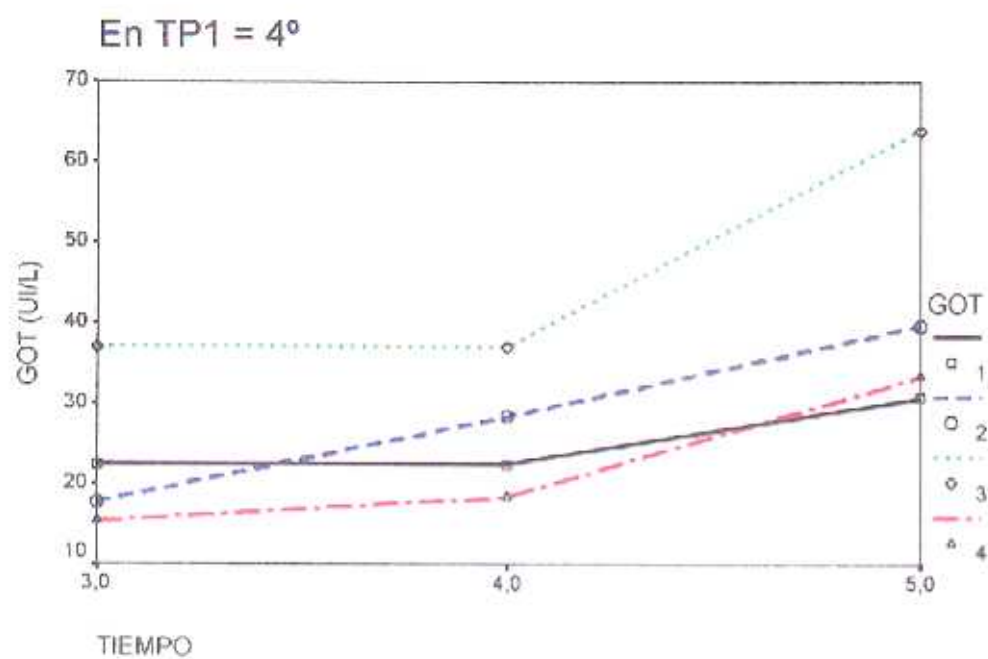


Fig.- 66. Suero a 4°C

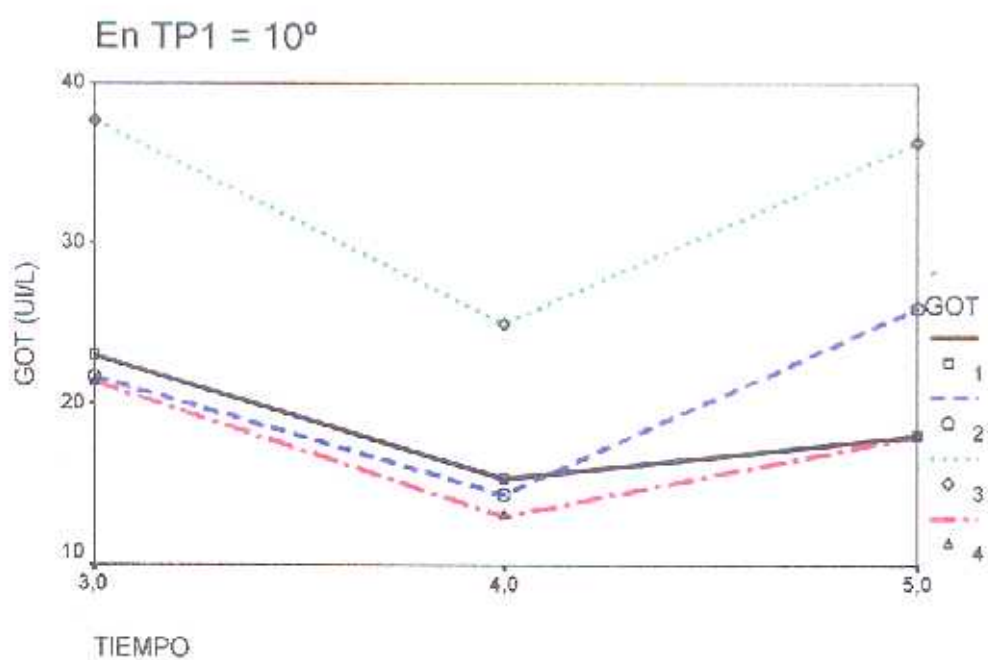


Fig.- 67. Suero a 10°C

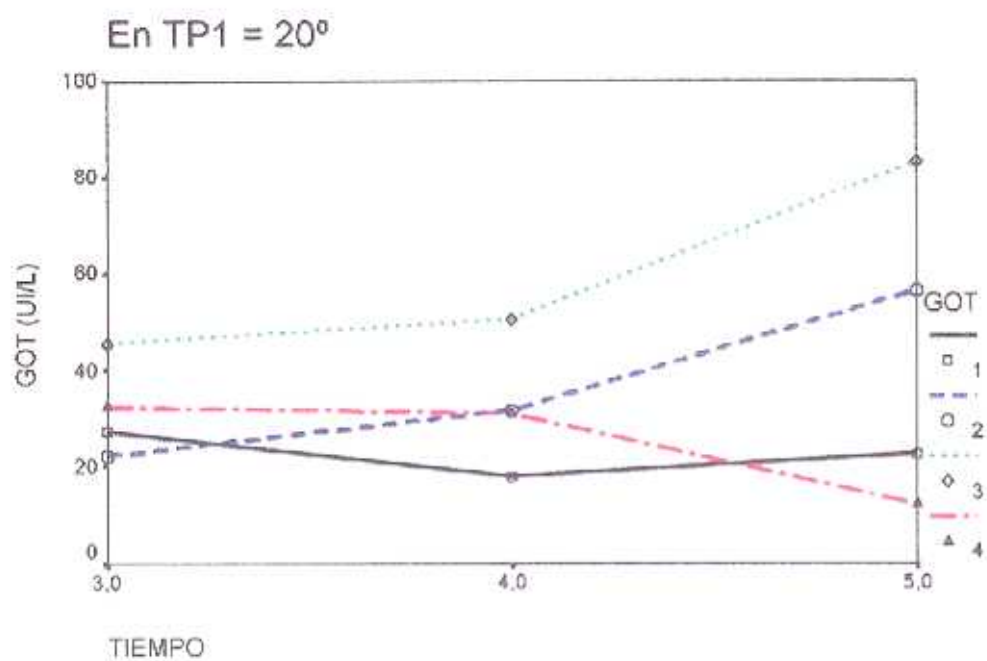


Fig.- 68. Suero a 20°C

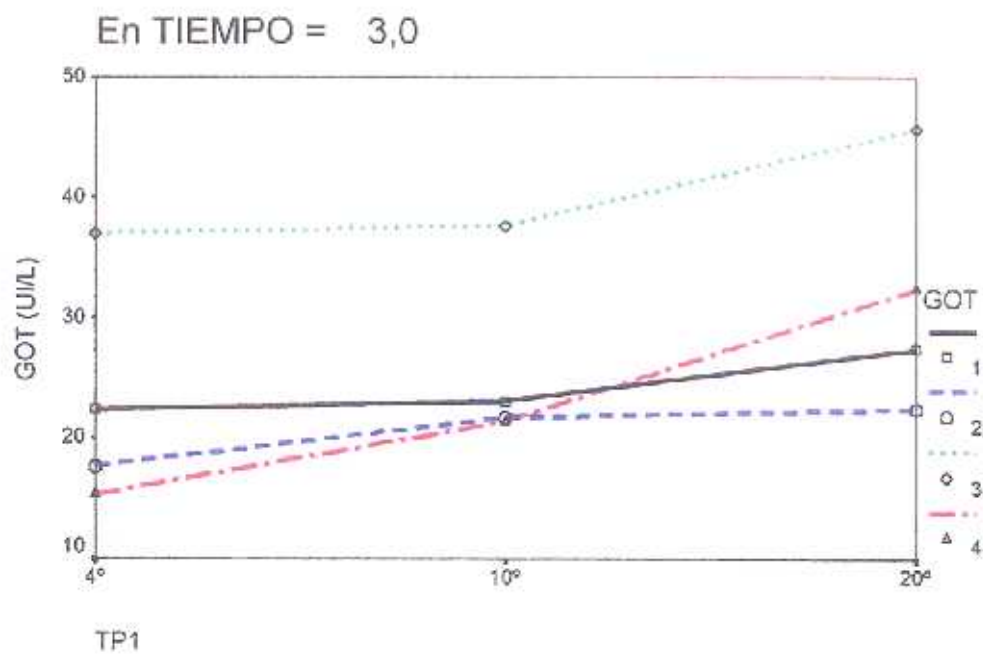


Fig.- 69. Isquemia de 3 h.

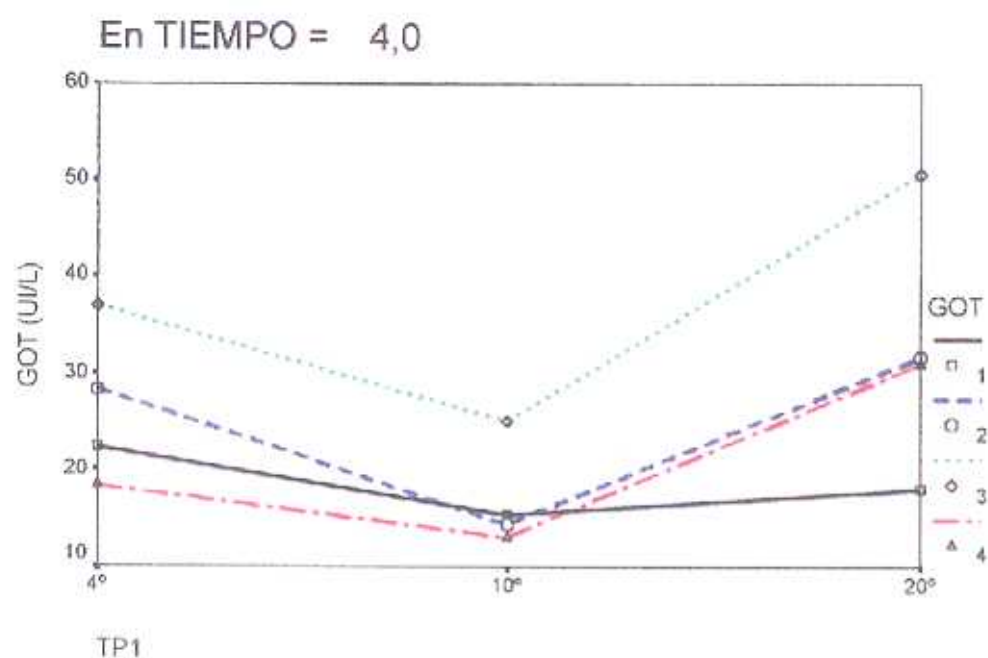


Fig.- 70. Isquemia de 4 h.

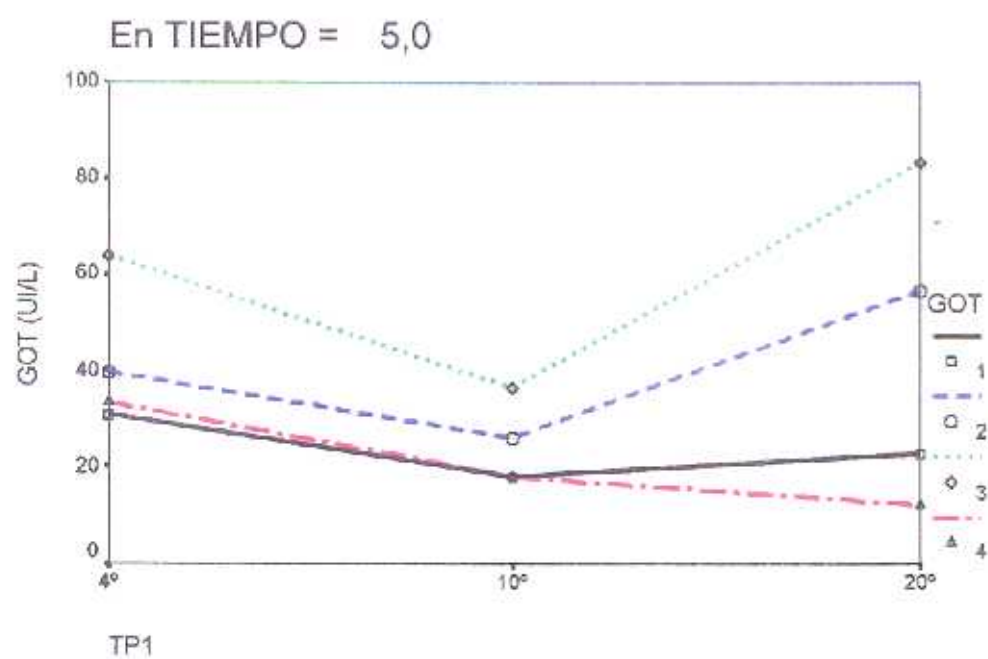


Fig.- 71. Isquemia de 5 h.

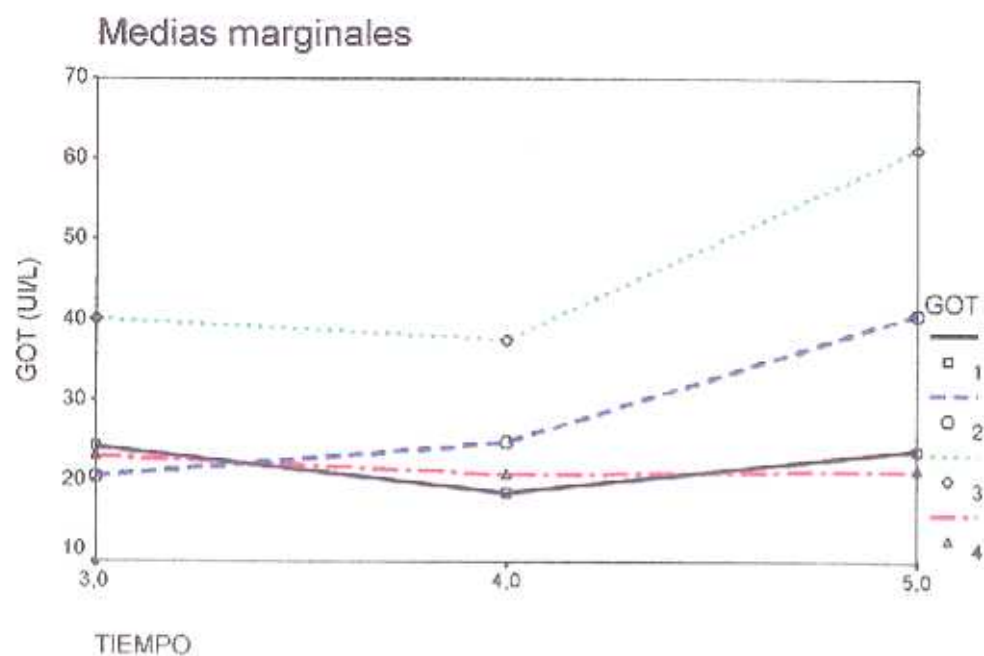


Fig.- 72. Tiempos de isquemia.

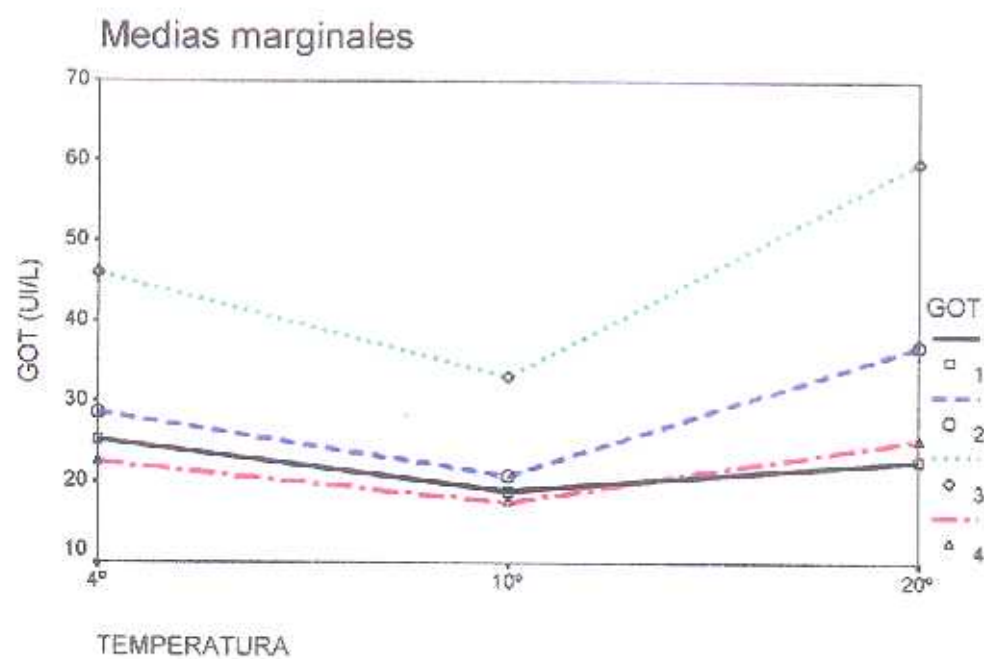


Fig.- 73. Temperaturas de perfusión

TABLA – XVI: Pruebas de efectos intra-sujetos.

Medida:

Esfericidad asumida

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
GOT	10730,769	3	3576,923	83,834	,000	251,502	1,000
GOT * TIEMPO	2571,259	6	428,543	10,044	,000	60,264	1,000
GOT * TP1	1491,981	6	248,664	5,828	,000	34,968	,995
GOT * TIEMPO * TP1	2265,741	12	188,812	4,425	,000	53,103	,999
Error(GOT)	2304,000	54	42,667				

a. Calculado con alfa = ,05

TABLA – XVII: Pruebas de los efectos inter-sujetos

Medida:

Variable transformada: Promedio

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
Intercept	23837,225	1	23837,225	615,448	,000	615,448	1,000
TIEMPO	679,407	2	339,704	8,771	,002	17,541	,940
TP1	852,282	2	426,141	11,002	,001	22,005	,977
TIEMPO * TP1	326,231	4	81,558	2,106	,122	8,423	,508
Error	697,167	18	38,731				

a. Calculado con alfa = ,05

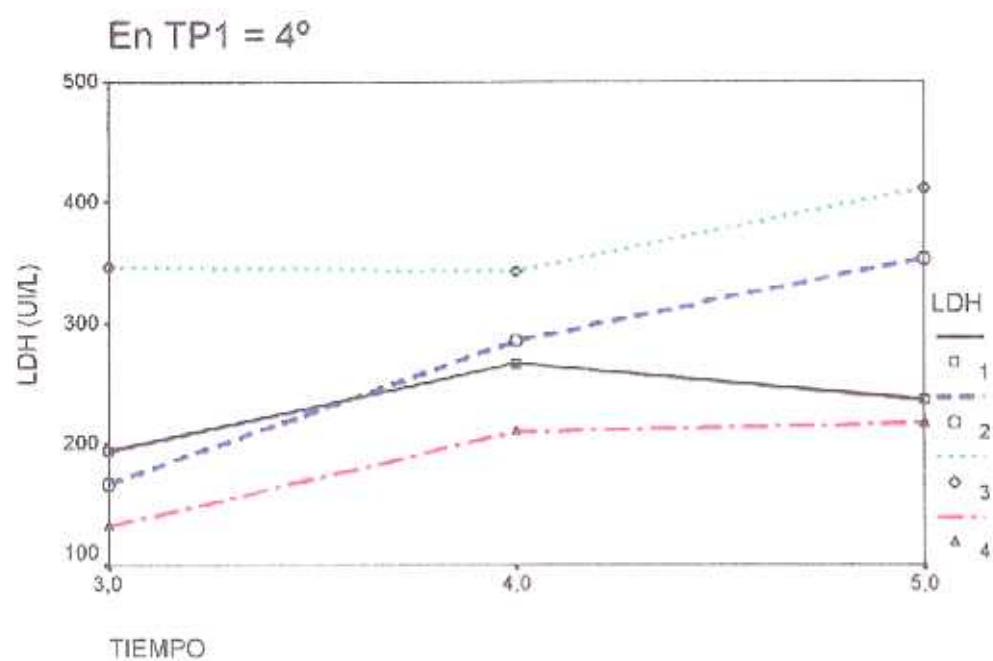


Fig.- 74. Suero a 4°C

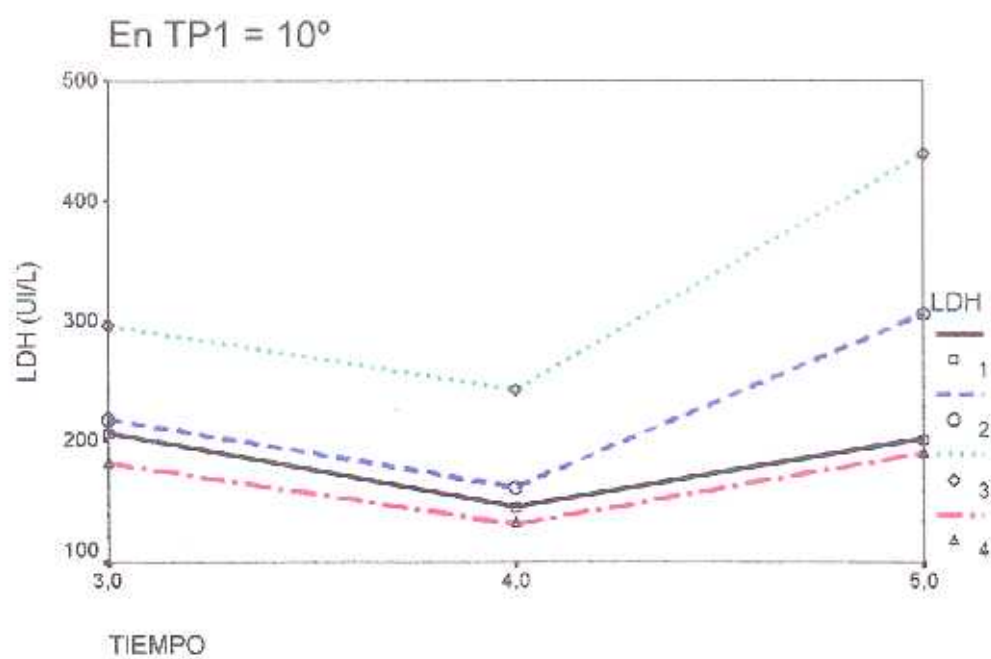


Fig.- 75. Suero a 10°C

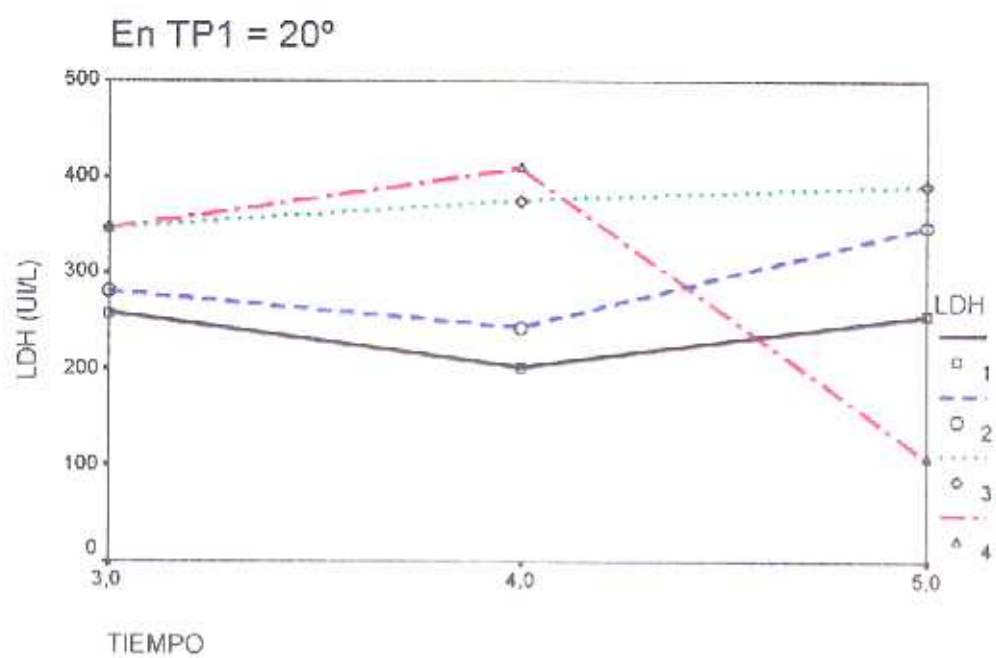


Fig.- 76. Suero a 20°C

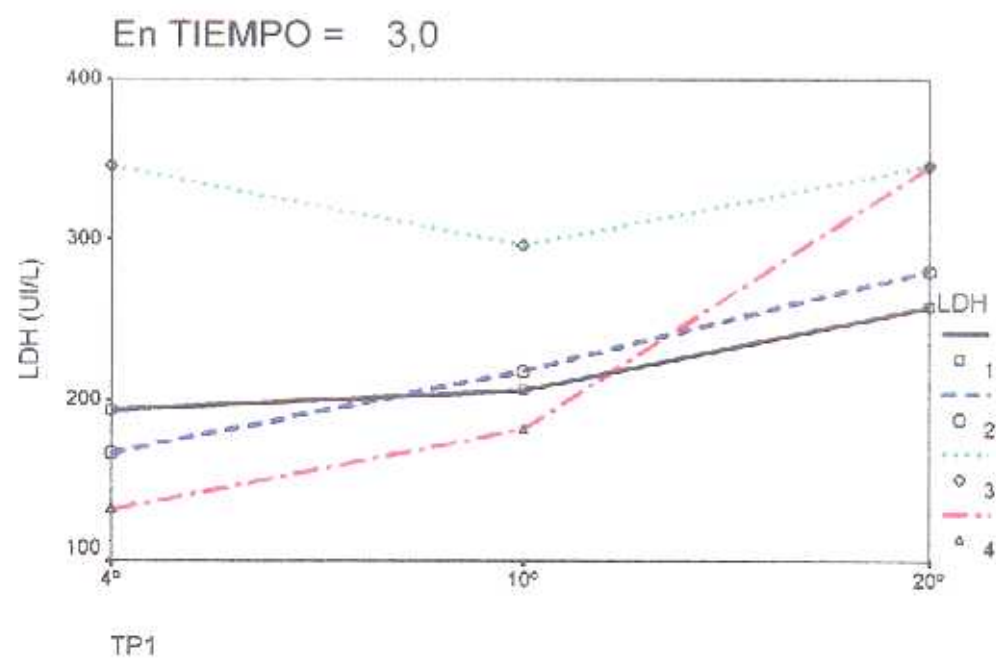


Fig.- 77. Isquemia de 3 h.

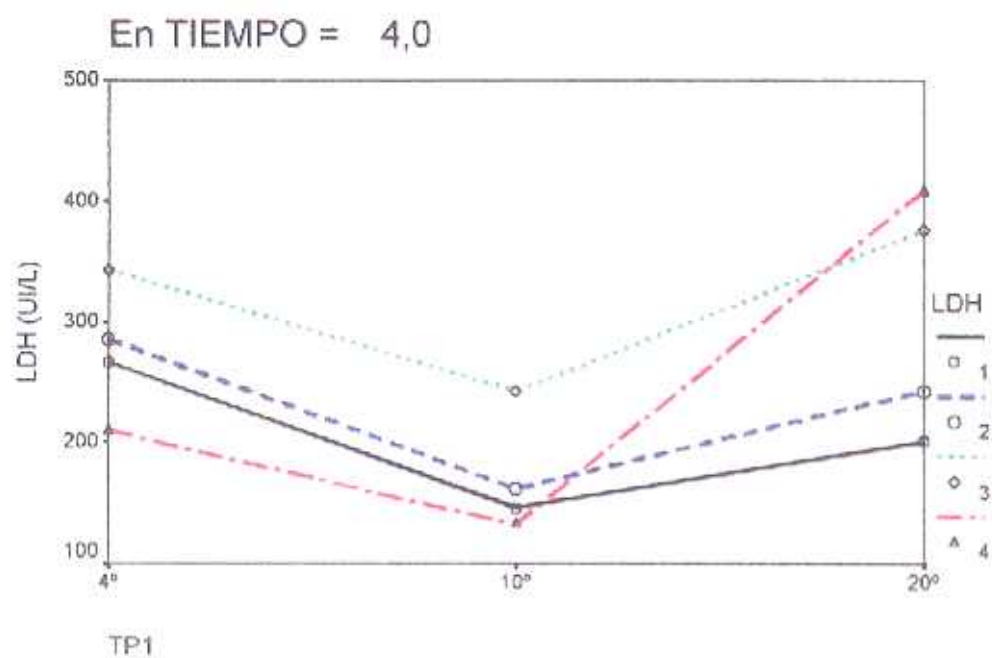


Fig.- 78. Isquemia de 4 h.

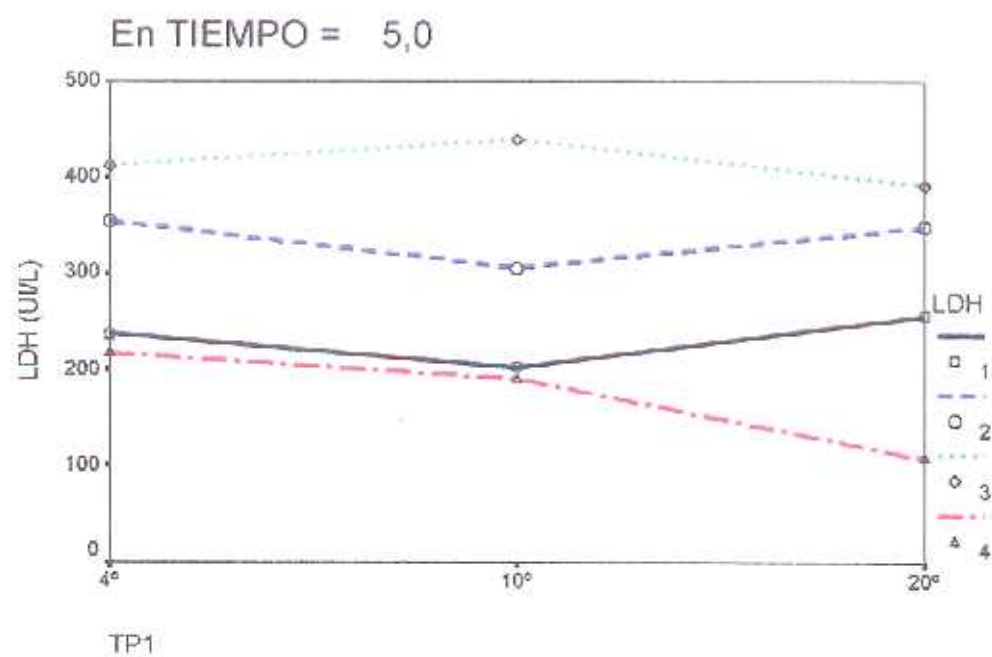


Fig.- 79. Isquemia de 5 h.

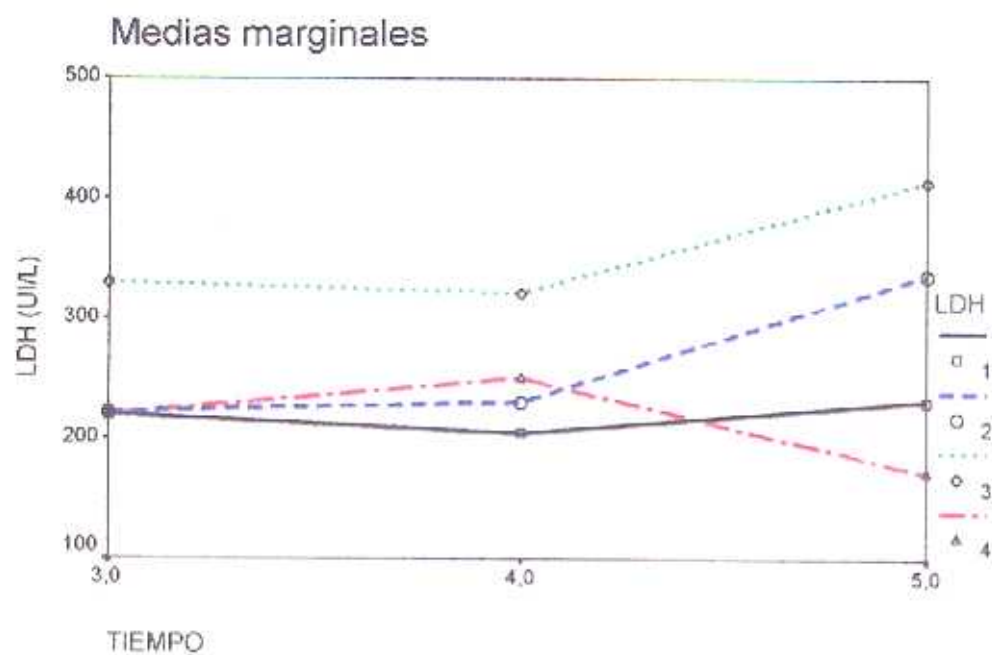


Fig.- 80. Tiempos de isquemia.

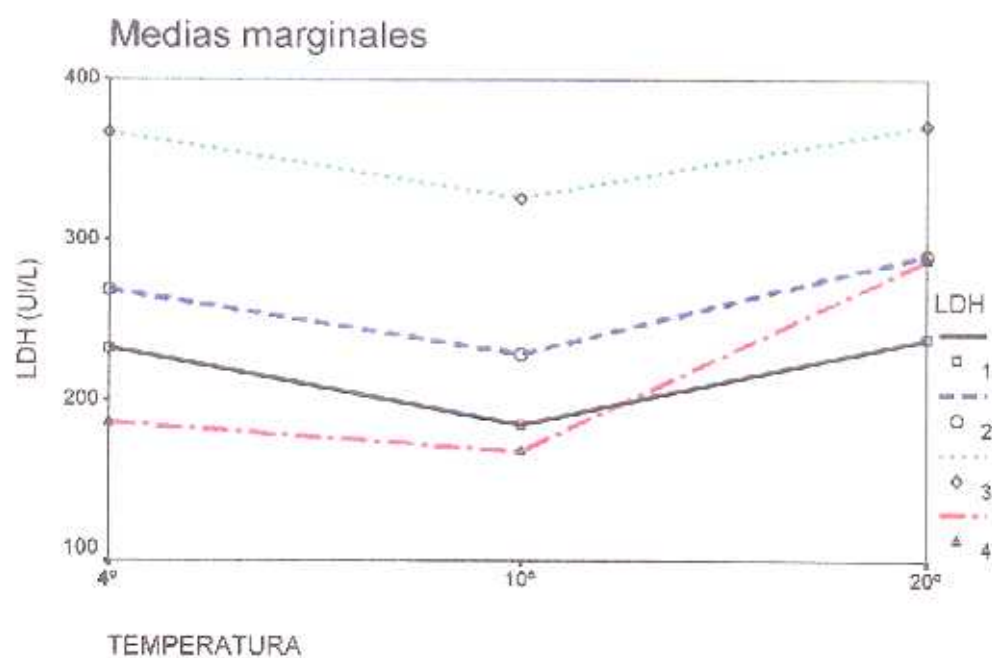


Fig.- 81. Temperaturas de perfusión

TABLA – XVIII: Pruebas de efectos intra-sujetos.

Medida:

Esfericidad asumida

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
LDH	346787,704	3	115595,901	49,888	,000	149,665	1,000
LDH * TIEMPO	116137,630	6	19356,272	8,354	,000	50,122	1,000
LDH * TP1	30879,241	6	5146,540	2,221	,055	13,327	,733
LDH * TIEMPO * TP1	109676,759	12	9139,730	3,944	,000	47,334	,997
Error(LDH)	125123,167	54	2317,096				

a. Calculado con alfa = ,05

TABLA – XIX: Pruebas de los efectos inter-sujetos

Medida:

Variable transformada: Promedio

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
Intercept	1857057,815	1	1857057,815	497,653	,000	497,653	1,000
TIEMPO	9086,519	2	4543,259	1,217	,319	2,435	,232
TP1	22122,394	2	11061,197	2,964	,077	5,928	,505
TIEMPO * TP1	26784,273	4	6696,068	1,794	,174	7,178	,439
Error	67169,375	18	3731,632				

a. Calculado con alfa = ,05

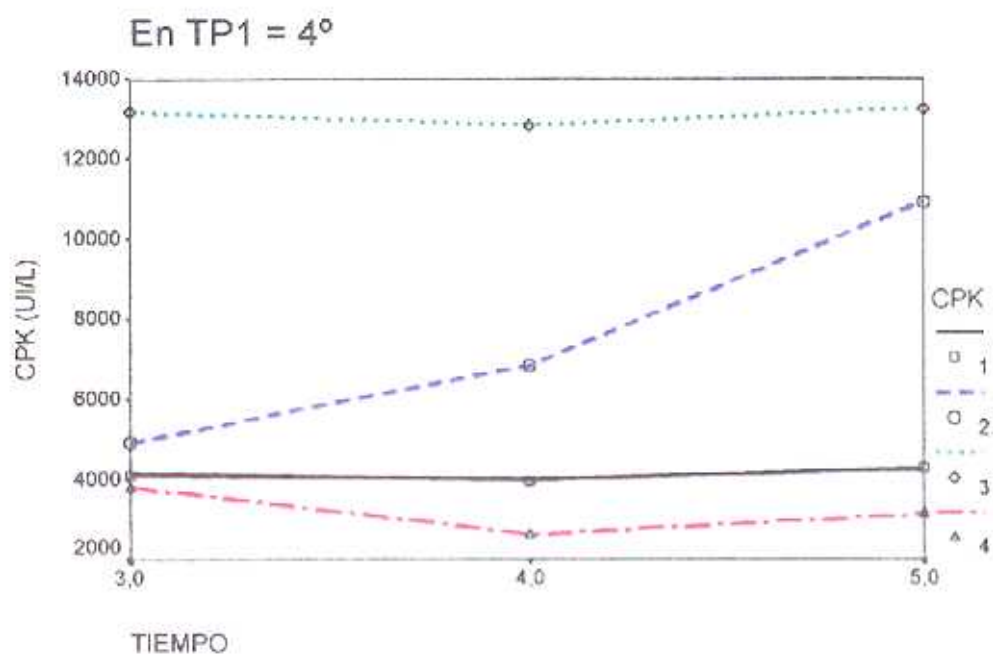


Fig.- 82. Suero a 4°C

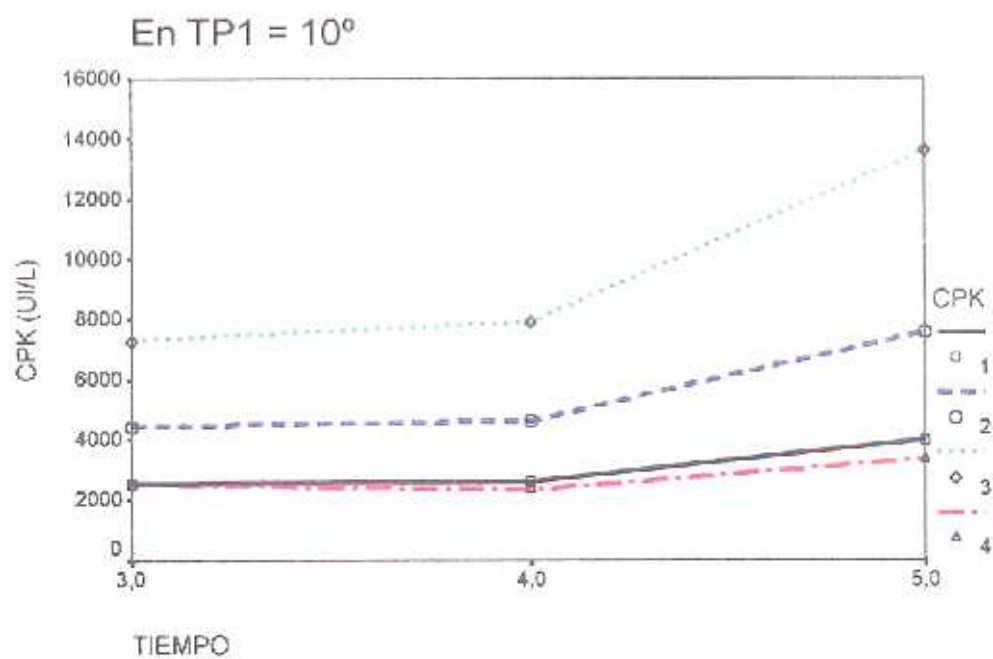


Fig.- 83. Suero a 10°C

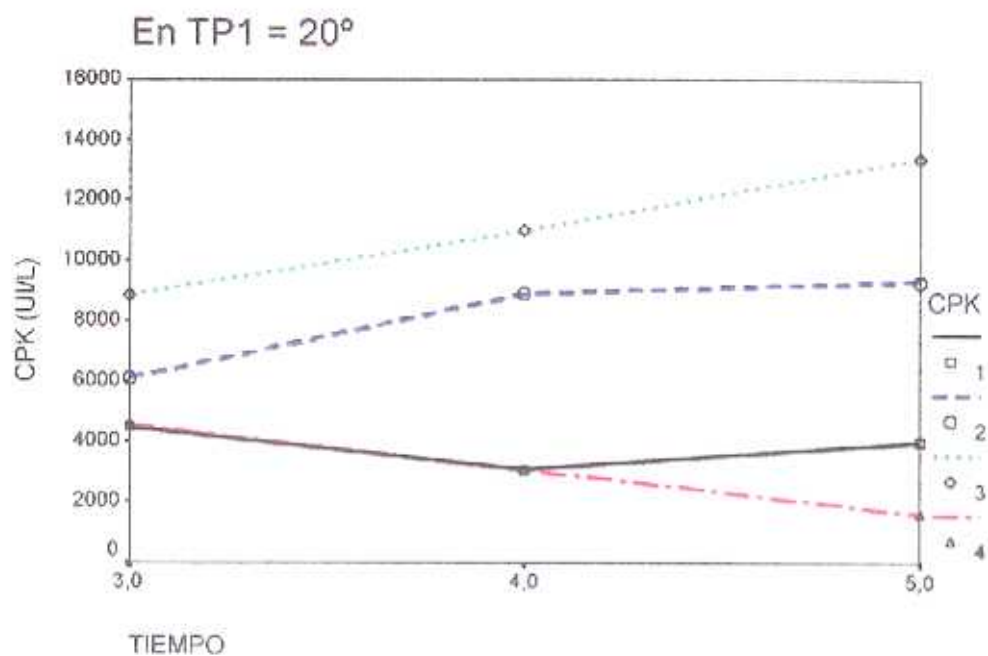


Fig.- 84. Suero a 20°C

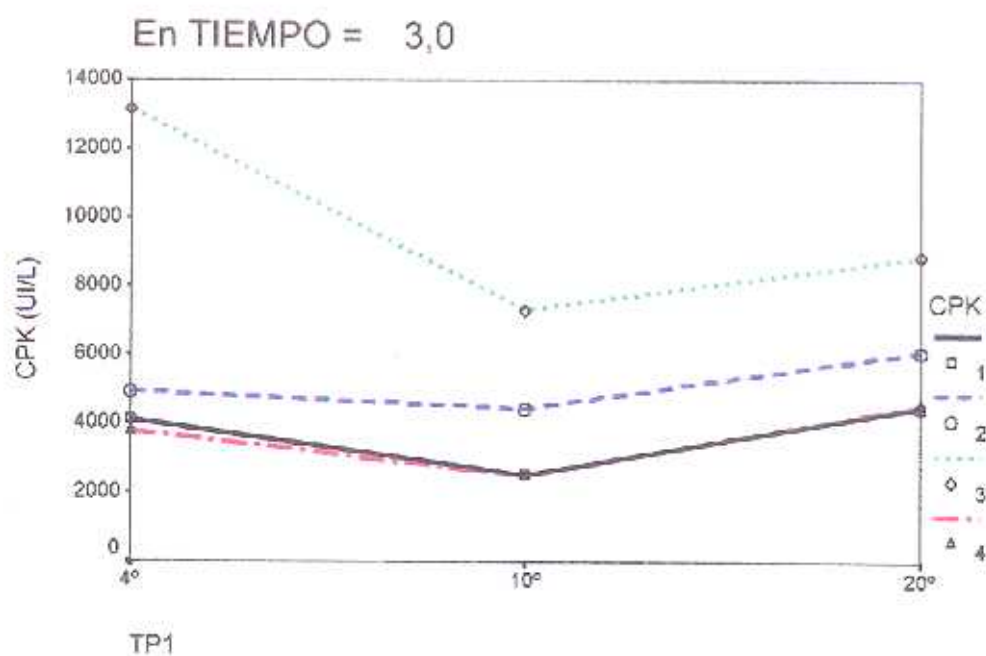


Fig.- 85. Isquemia de 3 h.

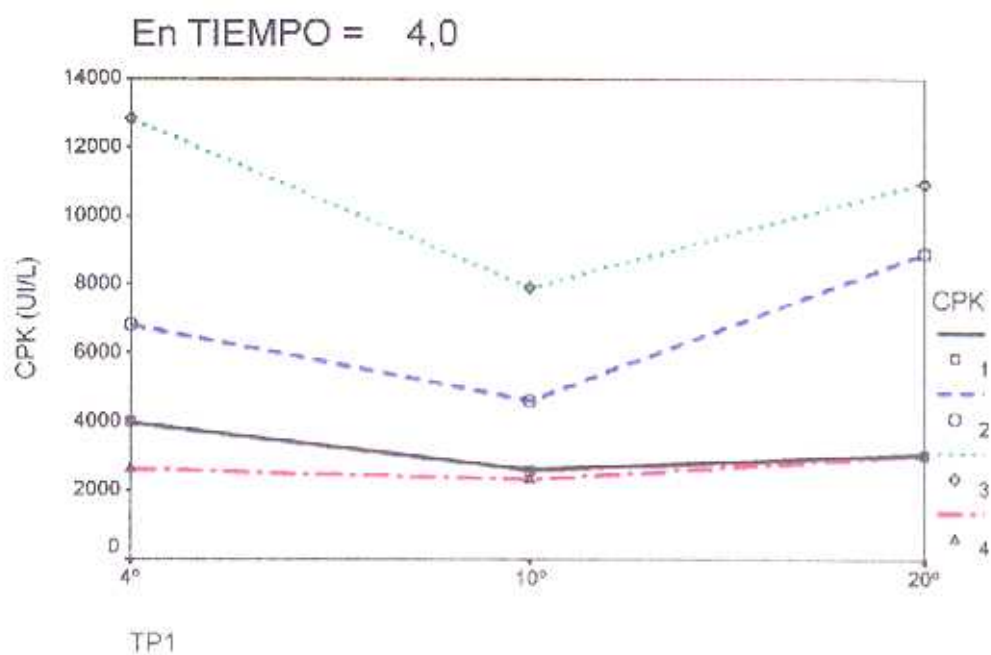


Fig.- 86. Isquemia de 4 h.

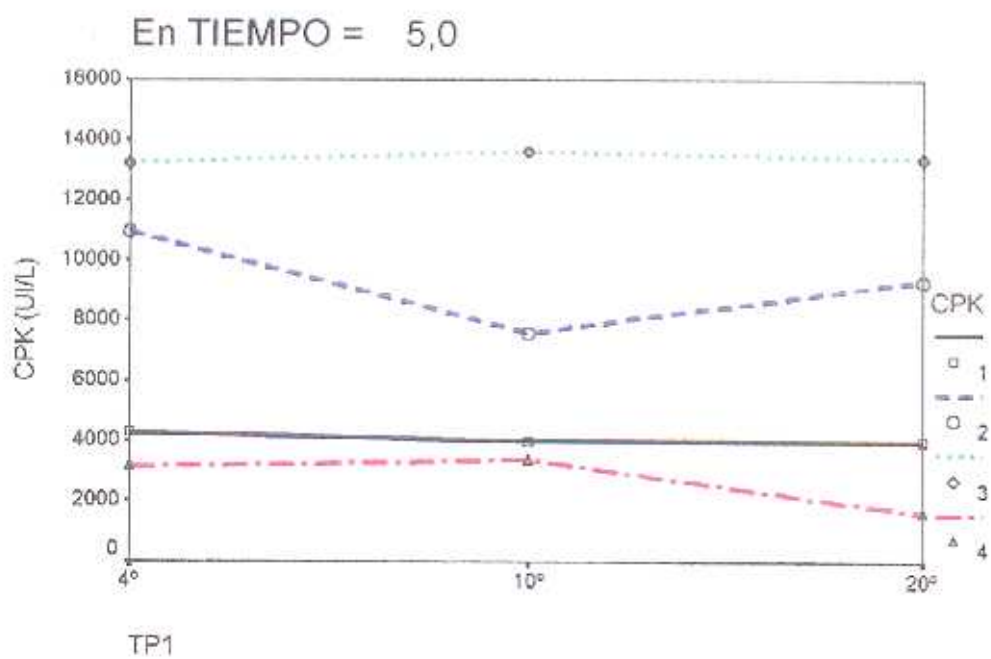


Fig.- 87. Isquemia de 5 h.

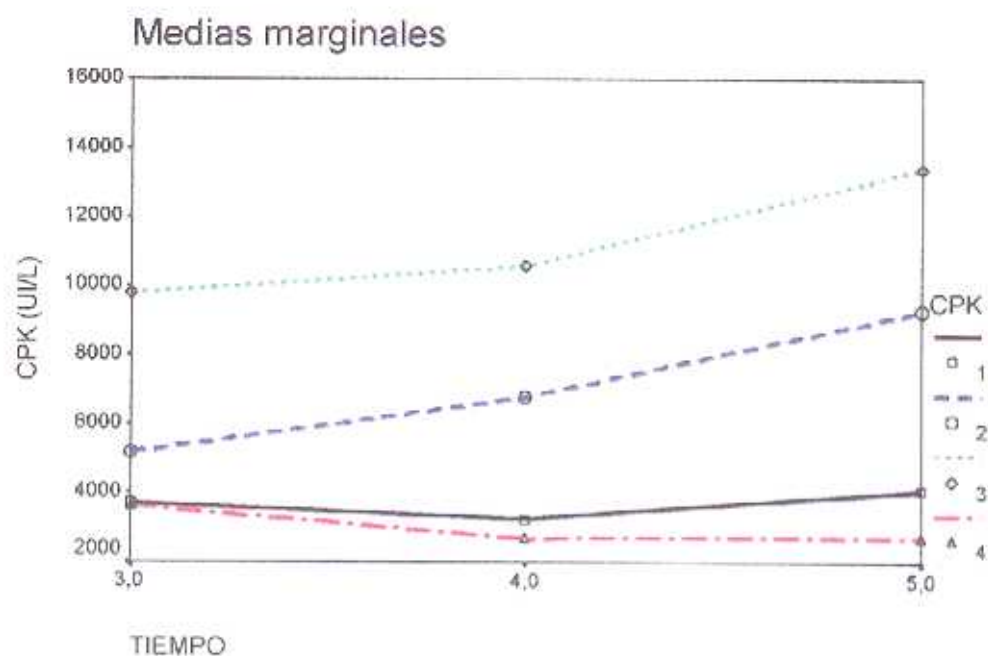


Fig.- 88. Tiempos de ischemia.

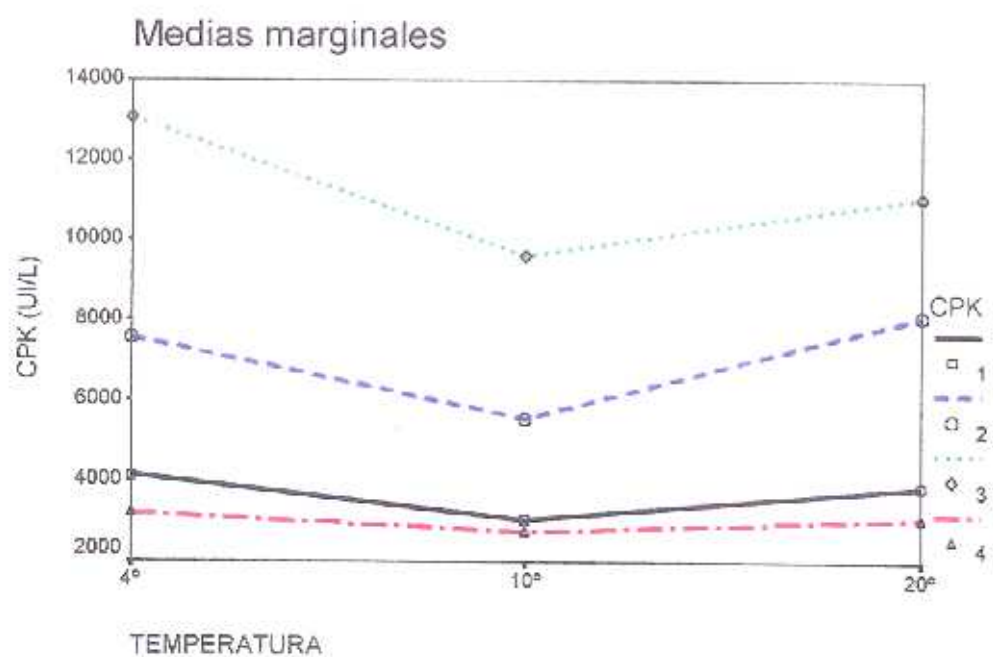


Fig.- 89. Temperaturas de perfusión

TABLA – XX: Pruebas de efectos intra-sujetos.

Medida:

Esfericidad asumida

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
CPK	1162209745,407	3	387403248,469	147,162	,000	441,486	1,000
CPK *							
TIEMPO	83184284,815	6	13864047,469	5,267	,000	31,599	,990
CPK * TP1	34551031,315	6	5758505,219	2,187	,058	13,125	,726
CPK *							
TIEMPO *	51288170,963	12	4274014,247	1,624	,113	19,483	,766
TP1							
Error(CPK)	142154766,000	54	2632495,667				

a. Calculado con alfa = ,05

TABLA – XXI: Pruebas de los efectos inter-sujetos

Medida:

Variable transformada: Promedio

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
Intercept	1052051648,926	1	1052051648,926	271,605	,000	271,605	1,000
TIEMPO	17183019,685	2	8591509,843	2,218	,138	4,436	,393
TP1	14999750,449	2	7499875,225	1,936	,173	3,872	,348
TIEMPO * TP1	4549638,815	4	1137409,704	,294	,878	1,175	,101
Error	69722202,000	18	3873455,667				

a. Calculado con alfa = ,05

C.- Estudio Histológico

1.- Estudio Macroscópico

Las piezas musculares estudiadas se extraen a la semana de haber permanecido la extremidad del conejo en isquemia. Antes de sacrificarlo, se procede a la disección de la piel de la pata, para comprobar el color de los músculos, la circulación sanguínea, la morfología de los nervios y la cicatrización.

Las extremidades perfundidas con suero fisiológico a 20°C presentan un color rojizo claro, más acusado cuantas más horas de isquemia han soportado y, además, de consistencia gelatinosa (más notorio a las 5 horas), con seroma ocasional, fibrina y cicatrización lenta de la herida a mayores horas de isquemia. Los músculos perfundidos a 4°C tienen un color pálido y de consistencia dura (siendo leñosa a las 5 horas), con seromas frecuentes en las heridas, cicatrización más lenta de las mismas, gran cantidad de fibrina que envuelve los vasos y el nervio femoral y edema de la pata (más notorio a las 5 horas). Al observar los músculos perfundidos con solución a 10°C su aspecto es distinto, apareciendo de color rojo y consistencia normal, seroma escaso y ocasional, cicatrización normal de las heridas y menor cantidad de fibrina.

2.- Microscopía Óptica

Al estudiar con microscopio óptico el vientre medial del músculo gastrocnemio basal, se observa que es de tipo mixto; es decir, con fibras tipo I y II, y variabilidad en el tamaño de las mismas. La tinción con hematoxilina y eosina (**Fig.90**) y el tricrómico de Masson (**Fig.91**) nos muestran la variabilidad de las fibras; la tinción de Oil-Red tiñe de naranja la grasa interfibrilar. La técnica histoquímica de la ATP-asa a pH 9,4 (**Fig.92**) nos muestra los dos diferentes tipos de fibras, las tipo I son claras y pequeñas, sin actividad ATP, las tipo II son oscuras y grandes. Las técnicas de NADH (**Fig.93**) y SDH (**Fig.94**) colorean las fibras de manera inversa a la anterior, apareciendo las fibras tipo I oscuras y pequeñas y las tipo II claras y grandes.

Los músculos mantenidos en isquemia durante 3 horas presentan lesiones aisladas y dispersas, con calcificación, infiltrado inflamatorio y regeneración focales, basofilia del citoplasma y núcleos vesiculosos en los estudios con hematoxilina-eosina y Masson. Es menos manifiesto con perfusión a 20°C

(Fig.95) que con líquidos a 4°C, donde se puede observar fagocitosis en las lesiones y fibras tipo I con lesiones regenerativas aisladas (Fig.96). En los músculos perfundidos a 10°C no se aprecian alteraciones (Fig.97).

Con tiempos de isquemia de 4 horas las lesiones observadas son focales y aisladas, pero más frecuentes que con 3 horas. La perfusión a 20°C produce cambios degenerativos focales, fibras rotas, fagocitosis aisladas y un infiltrado inflamatorio, sin edema intersticial, con tinción de hematoxilina-eosina y Masson (Fig.98), y fibras tipo I con desorganización intermiofibrilar con la SDH. Con 4°C presenta las mismas lesiones (Fig.99). Con perfusión a 10°C observamos alteraciones degenerativas focales con hematoxilina-eosina y Masson, siendo la histoquímica normal (Fig.100).

Las lesiones más importantes y extensas las encontramos en los músculos mantenidos en isquemia durante 5 horas. Con suero a 20°C se aprecia necrosis de fibras, depósitos cálcicos, infiltrado inflamatorio y zonas de regeneración (infarto en evolución u organización) en las tinciones con hematoxilina-eosina (Fig.101) y Masson, con grasa en las fibras lesionadas y en los macrófagos con la tinción de Oil-Red. Con la técnica de la ATP-asa aparecen fibras tipo II con vacuolas y rotas, y ambos tipos de fibras con la NADH (Fig.102) y la SDH, pero focales. La perfusión a 4°C ocasiona las mismas lesiones pero más extensas, con afectación de ambos tipos de fibras en las tinciones histoquímicas (Fig.103 y 104). Con suero a 10°C las fibras musculares aparecen necrosadas, con depósitos cálcicos, infiltrado inflamatorio y zonas de regeneración focales (infarto en organización o evolución) con las tinciones de hematoxilina-eosina (Fig.105) y Masson, no observando alteraciones en el resto de técnicas.

3.- Microscopía Electrónica

A.- Músculo Estriado.

El músculo que se ha extraído como muestra basal se observa con arquitectura normal, mitocondrias intrafibrilares y perinucleares, sarcómeras, vasos con su célula endotelial sin lesiones, algún hematíe en su interior y membranas celulares intactas (3 000x) (Fig.106).

Los músculos mantenidos en isquemia durante 3 horas presentan lesiones mínimas. Los perfundidos con suero a 20°C presentan cuerpos mielinoideos o lipoideos, producto de la destrucción de orgánulos celulares, y una perfecta conservación de la sarcómera (20 000x) (Fig.110). En los

perfundidos a 4°C aparecen vacuolizaciones mitocondriales y homogenización miofibrilar focal, con una estructura hexagonal de actina-miosina conservada (12 000x) (Fig.112). Los mejor conservados son los músculos irrigados con suero a 10°C, en los que aparece la fibra muscular con glucógeno, un sistema reticular sin alteraciones, vasos sin lesiones y mitocondrias normales, aunque algunas aparecen hinchadas (20 000x) (Fig.111).

Con tiempos de isquemia de 4 horas, los músculos presentan grados de lesión diferentes. Los conejos perfundidos con suero a 20°C presentan vasos normales y algún hematíe extravasado ocasional, leve edema intersticial y fibras musculares con una estructura hexagonal conservada, núcleo intacto y mínima dilatación de la cisterna perinuclear y mitocondrias normales y otras rotas (7 000x) (Fig.113). En los perfundidos a 4°C se observan lesiones graves, con la presencia de fibroblastos interfibrilares y extravasación de hematíes, edema intersticial con haces de colágeno separados, vasos sanguíneos con vesículas de pinocitosis en su pared o colapsados y con pared endotelial rota, fibras musculares con alteración de la alineación de las sarcómeras sin rotura de la membrana nuclear, vacuolización del retículo endoplásmico y mitocondrias rotas o balonizadas, con cuerpos densos o estructuras laminares en su interior (7 000x) (Fig.114).

Los nervios intramusculares presentan rarefacción de la mielina, con células de Schwann con su núcleo, cisternas reticulares y abundantes mitocondrias (20 000x) (Fig.115). Con solución fisiológica a 10°C hallamos vasos sin alteraciones, fibras musculares con la presencia de gránulos de glucógeno, el sistema reticular y sarcómeras intactas (triada) (12 000x) (Fig.116) y (30 000x) (Fig.117), el núcleo con dilatación de la cisterna perinuclear y mitocondrias bien conservadas (20 000x) (Fig.118). Los nervios intramusculares tienen las vainas de mielina bien conservadas en capas, células perineurales y de Schwann intactas (12 000x) (Fig.119).

Las muestras musculares mantenidas en isquemia durante 5 horas presentan lesiones variadas. Los músculos perfundidos a 20°C presentan lesiones graves, como vesículas de pinocitosis en la pared del vaso, destrucción parcial de la célula endotelial (7 000x) (Fig.121), fibras musculares con edema intersticial y algunas rotas, mitocondrias balonizadas y con cuerpos densos intramitocondriales, sistema reticular dilatado y estructura hexagonal de actina-miosina conservada (20 000x) (Fig.120).

Los músculos perfundidos con solución a 4°C presentan las lesiones más graves, observándose un

músculo desestructurado, con pérdida de la alineación de las sarcómeras, fibroblastos interfibrilares, mitocondrias balonizadas y rotas, sistema reticular hinchado y roto (7 000x) (Fig.122), vasos con roturas endoteliales y cisterna perinuclear dilatada (7 000x) (Fig.107), vasos colapsados y extravasación de hematíes (3 000x) (Fig.108 y 109). Los conejos con perfusión a 10°C presentan lesiones musculares menos marcadas que en los casos anteriores, con fibras musculares conservadas, las sarcómeras alineadas, hinchazón leve del retículo endoplásmico, acúmulos de mitocondrias periféricos y mitocondrias intrafibrilares intactas (algunas con balonización), núcleo con retracción de la cisterna perinuclear y nucleolo intacto, vasos con pared nítida y con indentaciones, hematíes intravasculares y conservación de la estructura en hexágono de actina-miosina (7 000x) (Fig.123).

B.- Nervio Femoral.

Se han obtenido muestras del nervio femoral en los conejos mantenidos en isquemias de 4 y 5 horas.

En los nervios que han soportado 4 horas de isquemia a 20°C se observa la mielina rota, con homogenizado de la misma y vacuolas en las células de Schwann (3 000x) (Fig.124). La perfusión con suero a 4°C produce lesiones más graves, con cambios degenerativos irreversibles y desestructuración total de las vainas de mielina (4 400x) (Fig.126). Los nervios perfundidos a 10°C presentan lesiones leves, con la mielina bien estructurada, cuerpos mielinoideos y el núcleo celular sin alteraciones, presencia de células de Schwann a su alrededor, con el retículo endoplásmico rugoso, ribosomas y mitocondrias (algunas balonizadas) bien conservadas. Algún macrófago ocasional (7 000x) (Fig.128).

En los nervios mantenidos durante 5 horas a 20°C se aprecian dehiscencias y desestructuración de la vaina de mielina, con cuerpos mielinoideos, y células de Schwann vacuolizadas (3 000x) (Fig.125). Los nervios que han soportado el suero a 4°C presentan las lesiones más graves, con cambios degenerativos irreversibles, vacuolización lipídica y picnosis nuclear (12 000x) (Fig.127). Con suero a 10°C el nervio femoral presenta lesiones leves, observándose la mielina conservada, con neurotúbulos interiores y células de Schwann con alteraciones inespecíficas (vacuolas lipídicas). Algún fibroblasto aislado (7 000x) (Fig.129).

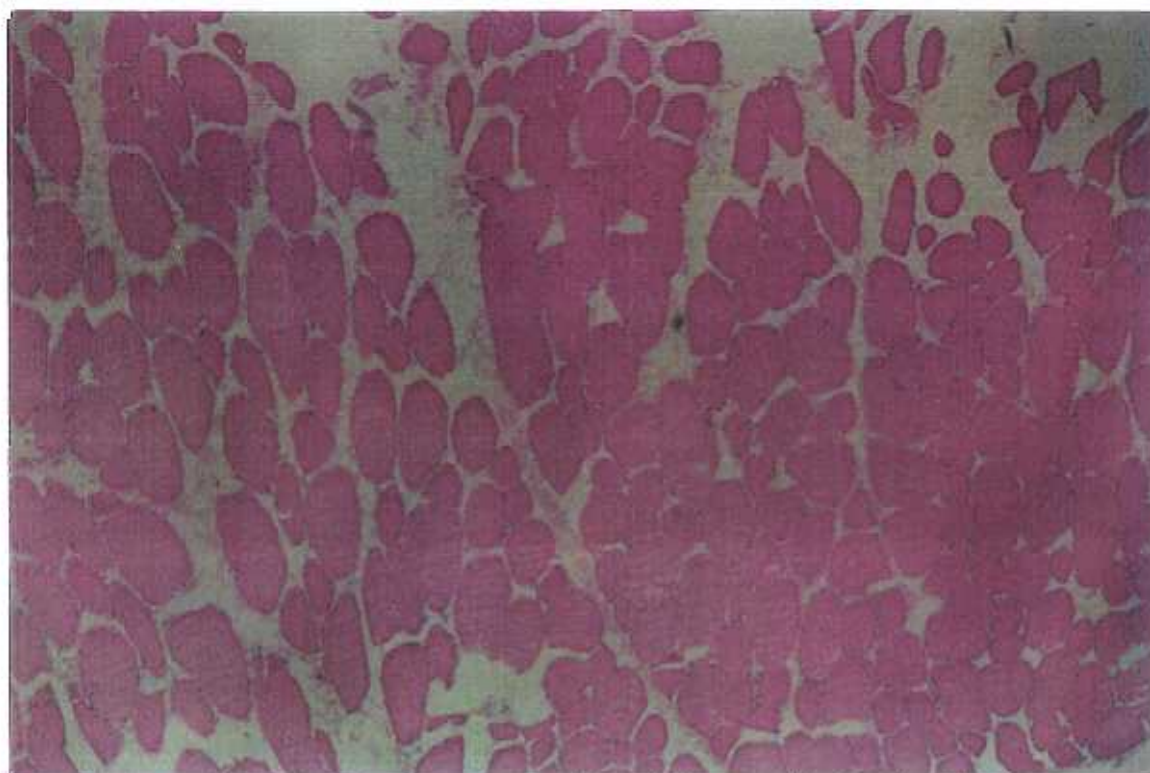


Fig.- 90. Músculo gastrocnemio basal: hematoxilina-eosina (4x2,5x).

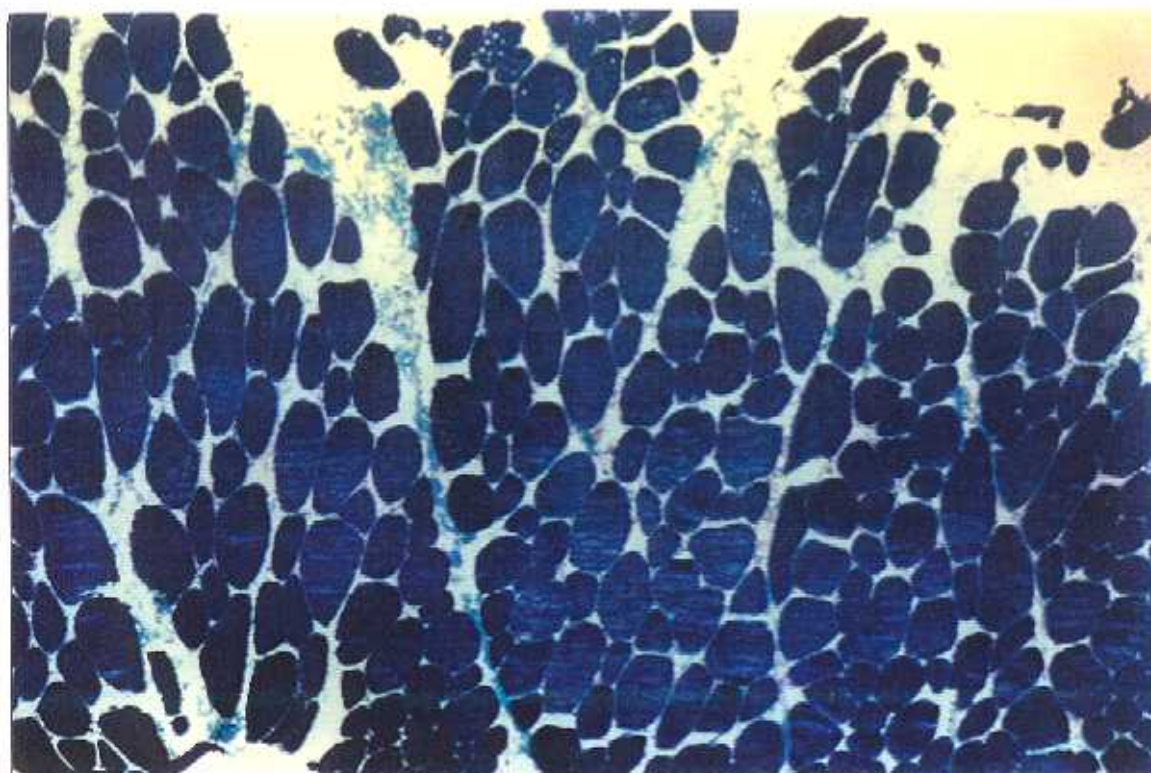


Fig.- 91. Músculo gastrocnemio basal: Masson (4x2,5x).



Fig.- 92. Músculo gastrocnemio basal: ATP-asa pH 9,4, mostrando los 2 tipos de fibra: tipo I: claras y pequeñas (↗); tipo II: oscuras y grandes (↘) (4x3,3x).



Fig.- 93. Músculo gastrocnemio basal: NADH, diferenciando los dos tipos de fibra: tipo I: oscuras y pequeñas (↘), y tipo II: claras y grandes (↗) (4x3,3x).

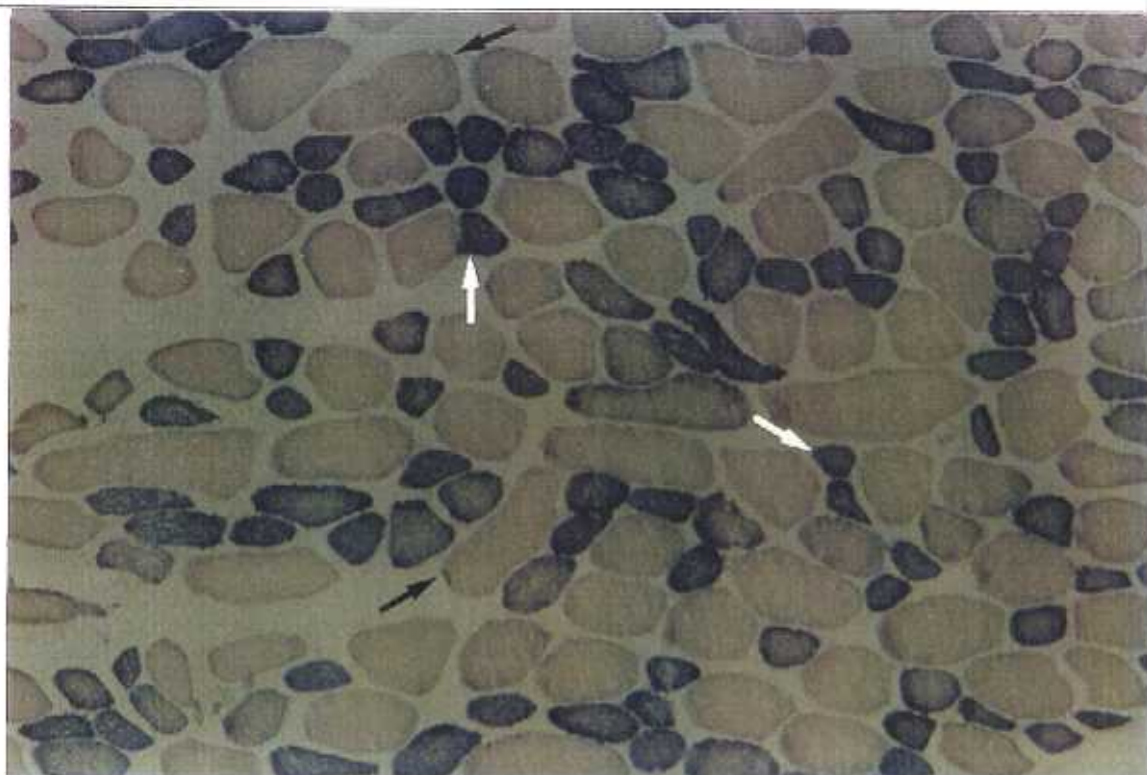


Fig.- 94. Músculo gastrocnemio basal: SDII, con los dos tipos de fibra: tipo I: oscuras y pequeñas (\rightarrow), tipo II: claras y grandes (\rightarrow) (4x3,3x).

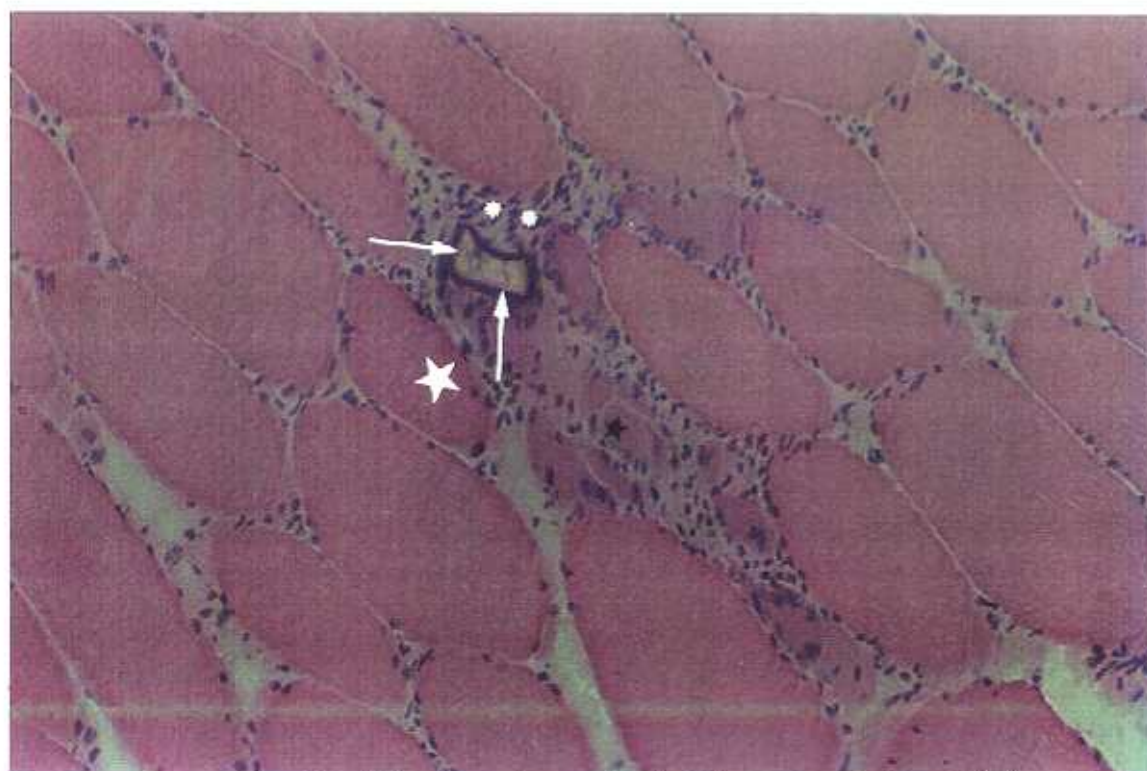


Fig.- 95. Músculo en isquemia de 3 h y perfusión a 20°C: hematoxilina-eosina. Presencia de un infiltrado inflamatorio (\oplus), calcificación aislada (\rightarrow), basofilia celular (\star) y células rotas en regeneración (\star) (10x4x).



Fig.- 96. Músculo en isquemia de 3 h y suero a 4°C: Masson.
Depósitos cálcicos (⇒), infiltrado inflamatorio (★)
y célula muscular teñida (★) (20x2,5x).



Fig.- 97. Músculo en isquemia de 3 h y perfusión a 10°C: NADH.
Fibras normales: tipo I (★) y tipo II (★) (10x4x).

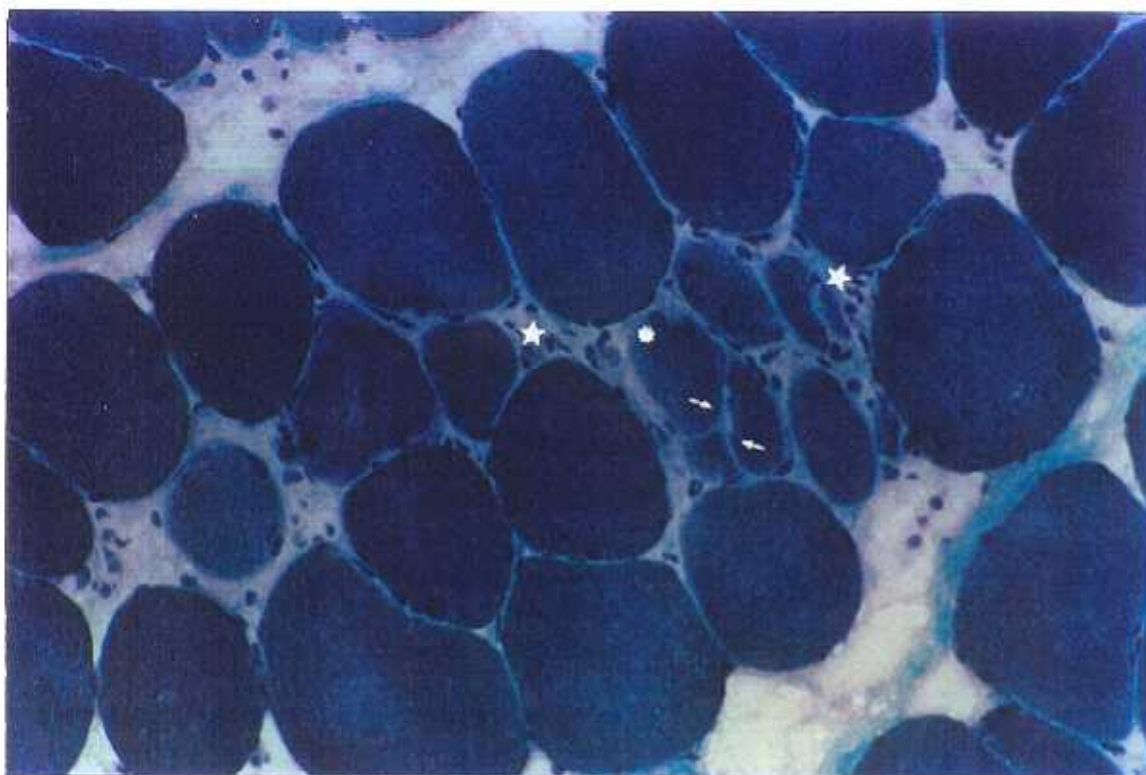


Fig.- 98. Músculo en isquemia de 4 h y suero a 20°C: Masson. Lesiones focales, con fagocitosis aisladas (*), células rotas (⇒) e infiltrado inflamatorio (☆) (20x2,5x).



Fig.- 99. Músculo en isquemia de 4 h y perfusión a 4°C: SDH. Fibras con desorganización inter miofibrilar: tipo I (⇒) y tipo II (→) (10x2,5x).

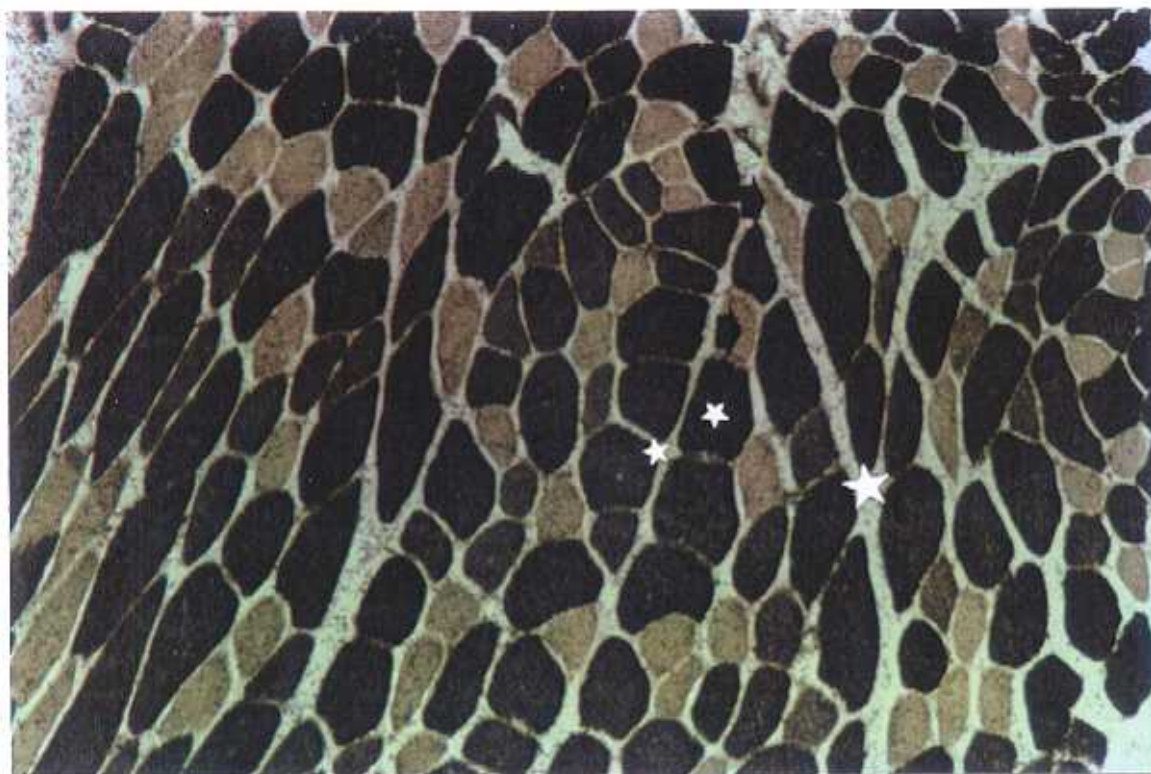


Fig.- 100. Músculo en isquemia de 4 h y suero a 10°C: ATP-asa.
Fibras normales: tipo I (■) y tipo II (☆) (4x4x).

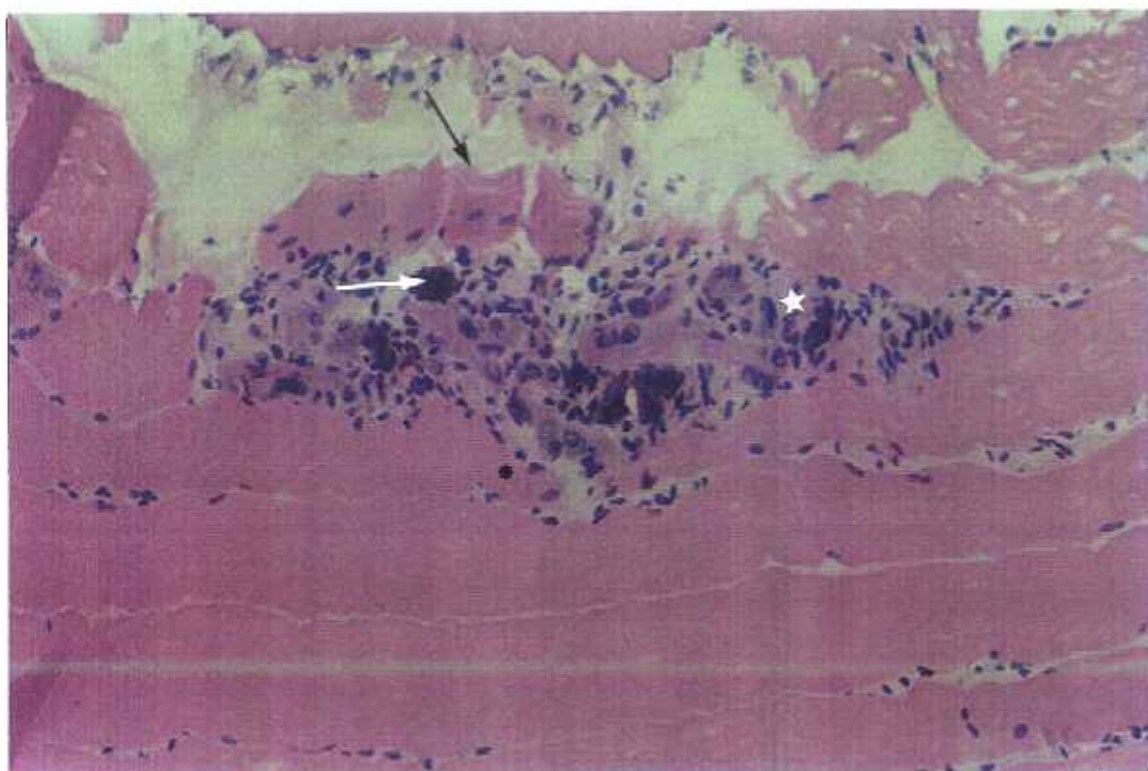


Fig.- 101. Músculo en isquemia de 5 h y suero a 20°C:
hematoxilina-eosina. Lesiones más intensas y generalizadas, con
fibras rotas (→), depósitos cálcicos (⇨),
infiltrado inflamatorio (☆) y zonas de regeneración (●) (10x4x).

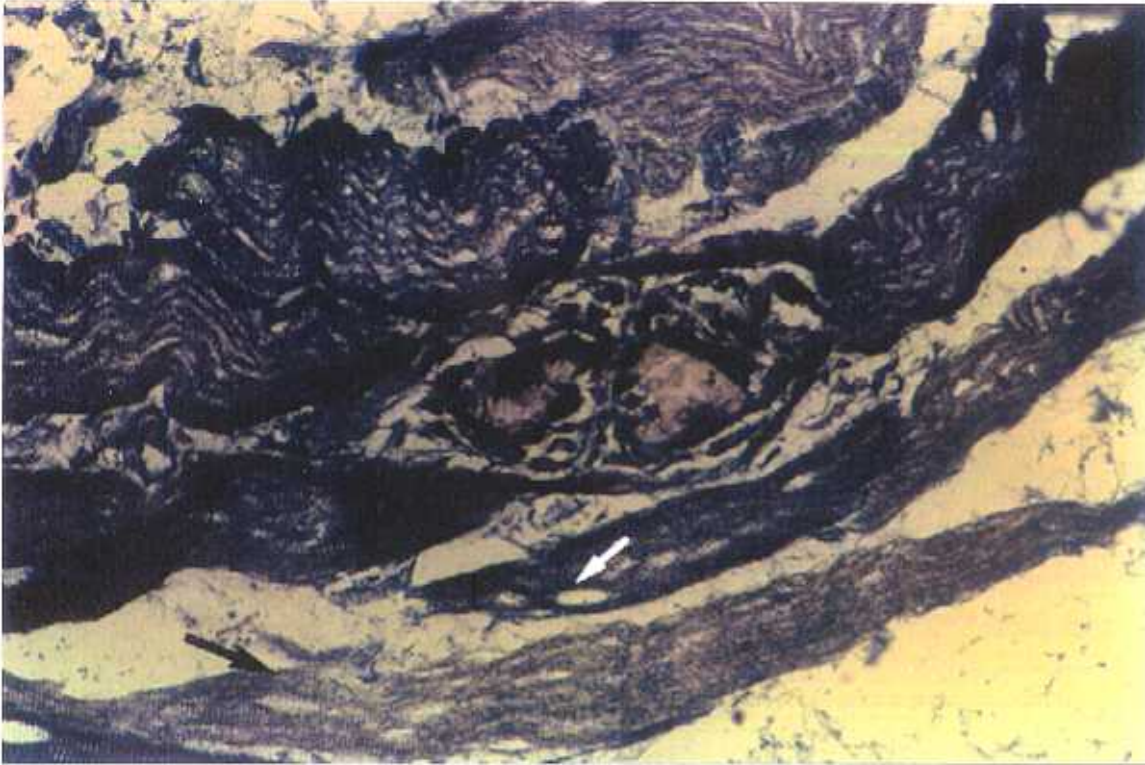


Fig.- 102. Músculo en isquemia de 5 h y suero a 20°C: NADH. Lesiones intensas de las fibras musculares, con vacuolas y rotas: tipo I (→) y tipo II (⇐) (20x3,3x).

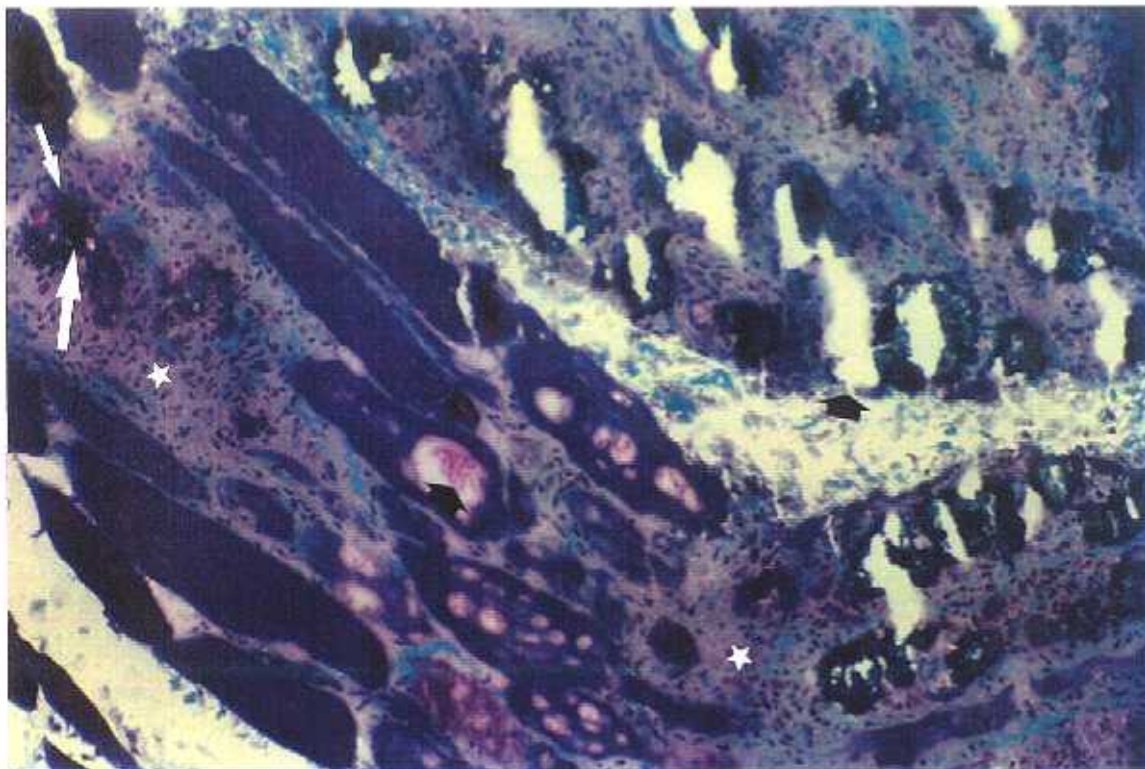


Fig.- 103. Músculo en isquemia de 5 h y perfusión a 4°C: Masson. Lesiones muy severas y generalizadas, con fibras rotas o necrosadas y con vacuolas (↑), depósitos cálcicos (→) e infiltrado inflamatorio (☆) (10x2,5x).

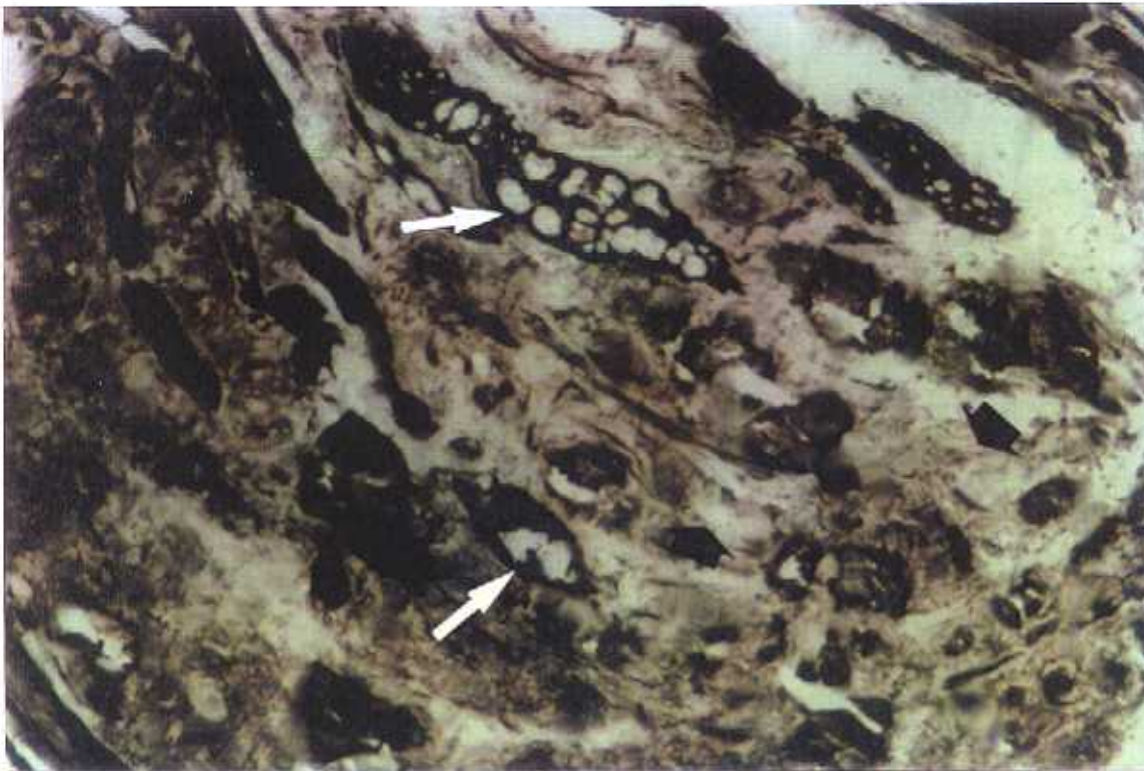


Fig.- 104. Músculo en isquemia de 5 h y perfusión a 4°C: ATP-asa. Fibras musculares con vacuolas y rotas, tipo I (♦) y tipo II (→) (4x5x).

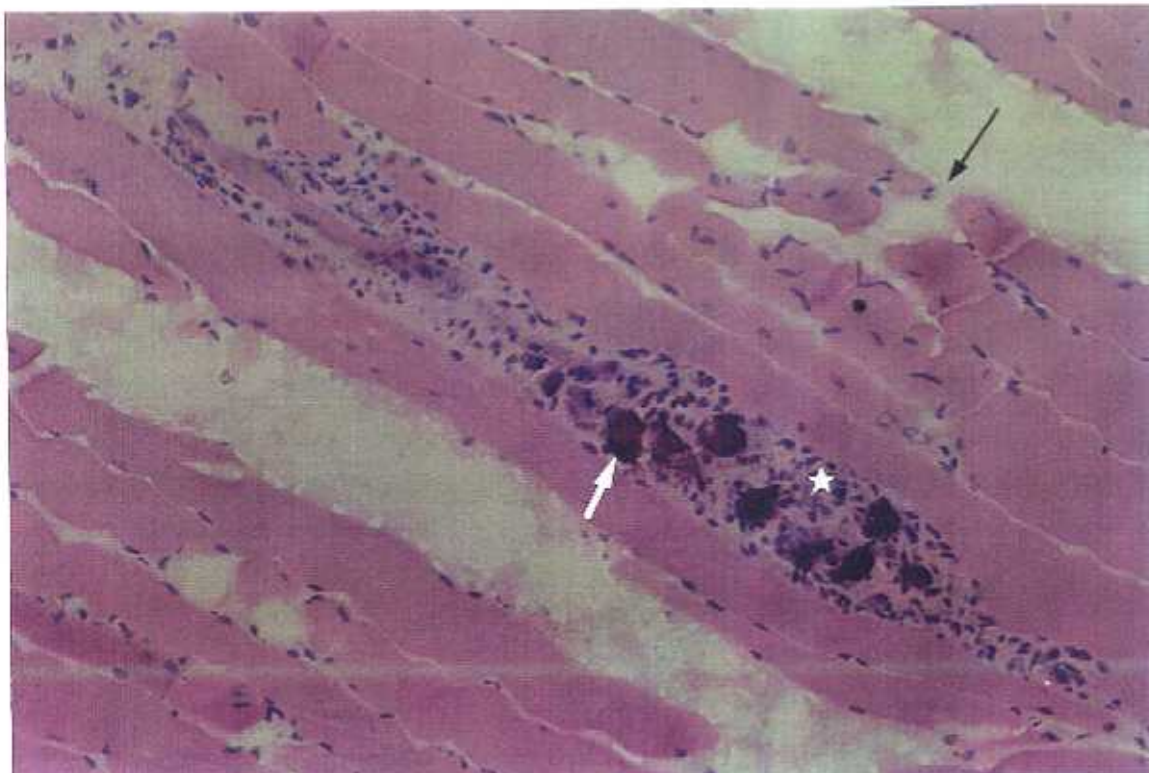


Fig.- 105. Músculo en isquemia de 5 h y suero a 10°C: hematoxilina-eosina. Presencia de fibras rotas (→), depósitos cálcicos (→), infiltrado inflamatorio (☆) y zonas de regeneración (●) (10x3,3x).

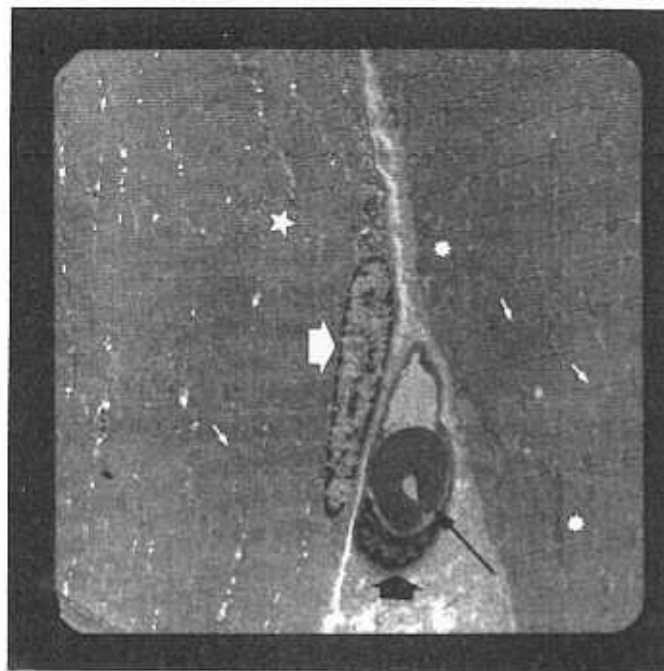


Fig.- 106. Músculo esquelético basal, con mitocondrias (⊗), miofilamentos ordenados (⇔), retículo endoplásmico y gránulos de glucógeno entre las sarcómeras (☆) y núcleo periférico (⇔). Presencia de un vaso, con un hematíe en su interior (→) y el núcleo de la célula endotelial periférico (♣) (3 000x).

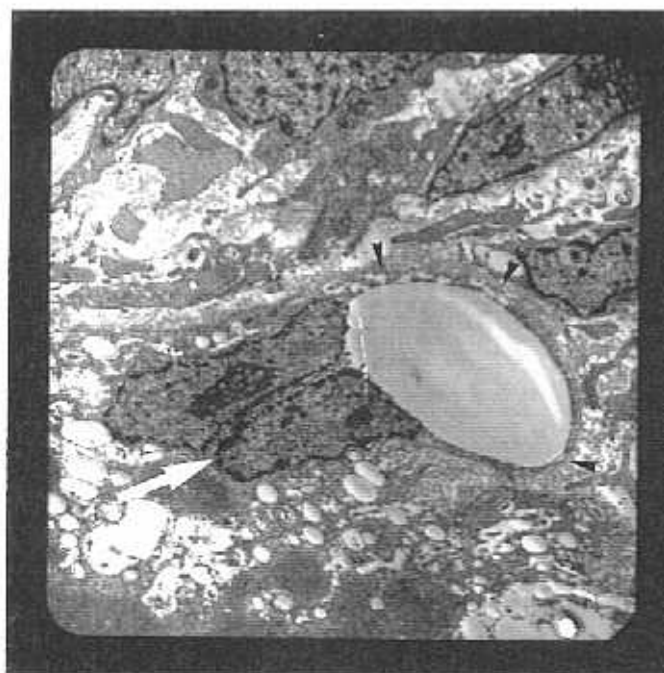


Fig.- 107. Músculo de 5 h de ischemia con suero a 4°C: presencia de un vaso con pared rota (▶) y cisterna perinuclear dilatada (⇔) (7 000x).

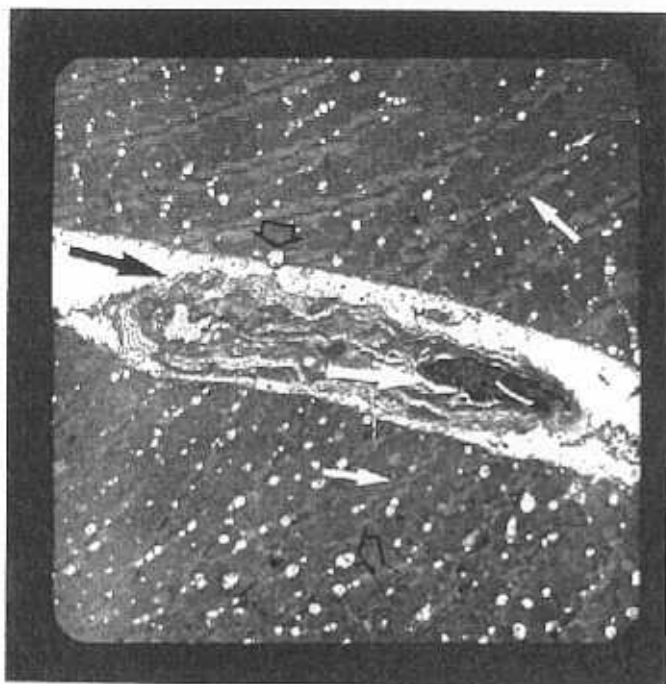


Fig.- 108. Músculos en isquemia de 4 y 5 h perfundidos con suero a 4°C: vaso colapsado con su pared rota (→) y dilatación de cisterna perinuclear (⇒); músculo con mitocondrias rotas o balonzadas (⊗) y desorganización miofibrilar (⇔) (3 000x).

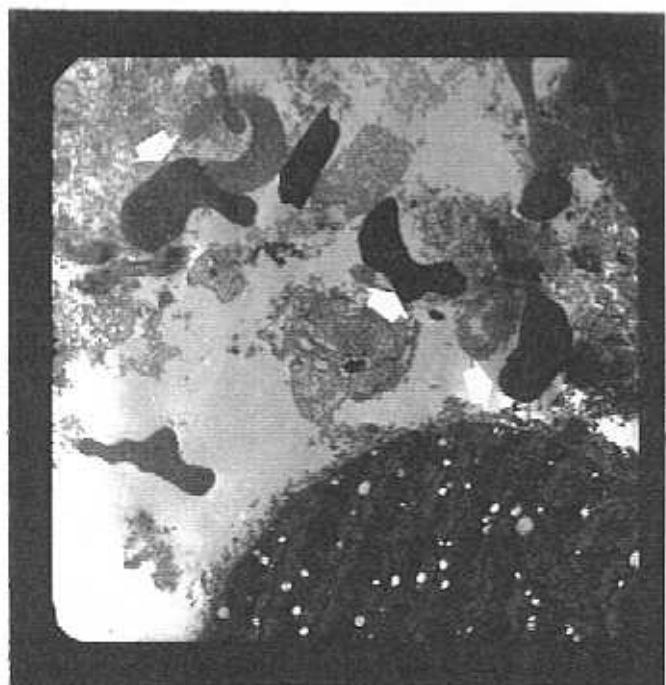


Fig.- 109. Idem: hematíes extravasados (⇒) (3 000x).



Fig.- 110. Músculo en isquemia de 3 h y perfusión a 20°C.
Miofilamentos ordenados (\Rightarrow) y cuerpos mielínoides o lipóideos
(producto de destrucción de orgánulos) (\Rightarrow) (20 000x).

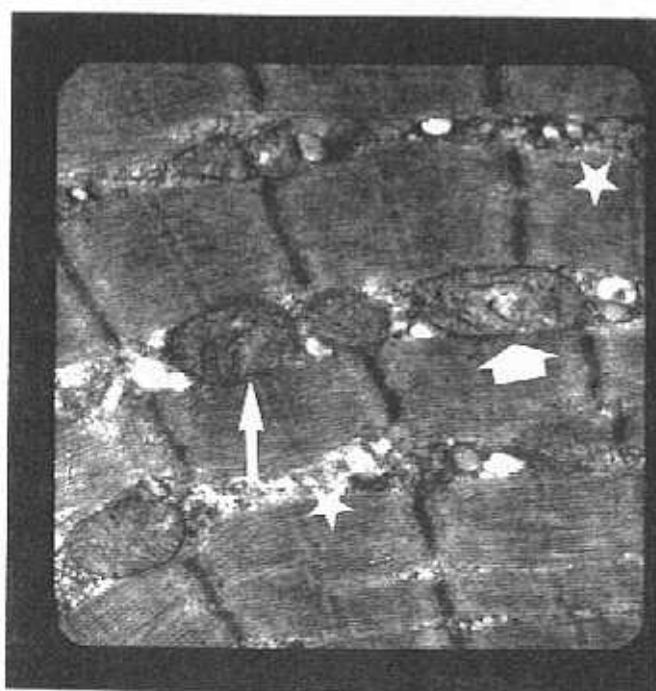


Fig.- 111. Músculo en isquemia de 3 h perfundido a 10°C.
Miofilamentos ordenados con mitocondrias normales (\Rightarrow)
y balonizadas (\Rightarrow), glucógeno y el sistema reticular (\star) (20 000x).

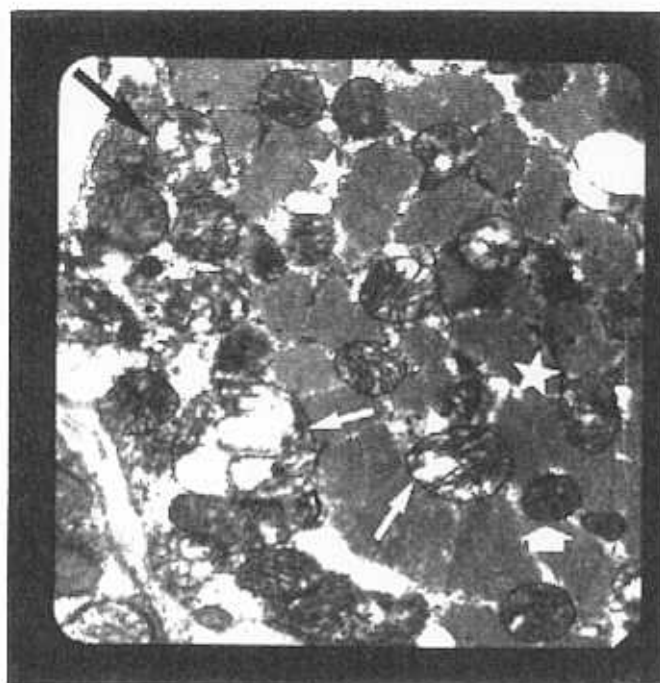


Fig.- 112. Músculo en isquemia de 3 h y perfusión a 4°C. Presencia de mitocondrias normales (\Rightarrow), hinchadas y con vacuolas (\rightarrow) y rotas (\rightarrow); vacuolización y homogenización miofibrilar focal (\star) (12 000x).



Fig.- 113. Músculo en isquemia de 4 h y perfusión a 20°C. Fibra muscular con mitocondrias bien conservadas (\Rightarrow) y alguna balonizada o rota (\rightarrow) y dilatación de la cisterna perinuclear (\Rightarrow); vaso con un hematocrit en su interior (\star) y célula endotelial con dilatación incipiente de la cisterna perinuclear (\rightarrow). Leve edema intersticial (\star) (7 000x).

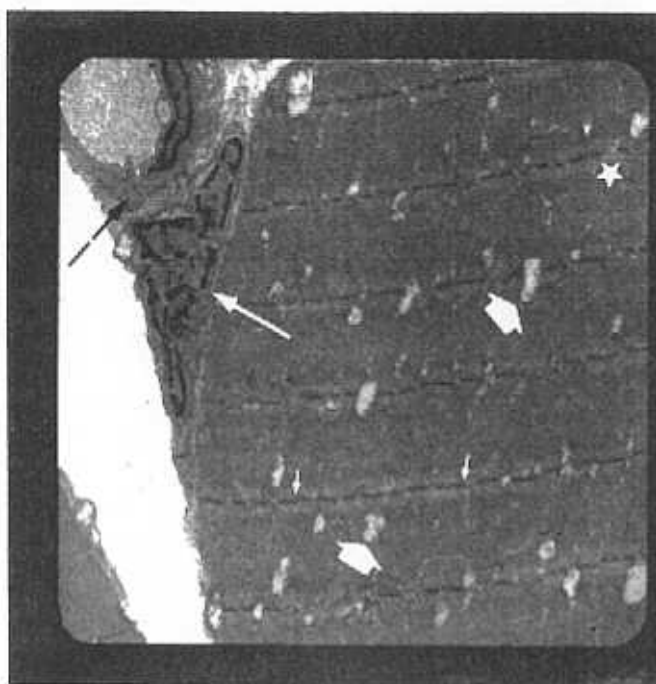


Fig.- 114. Músculo en isquemia de 4 h y perfusión a 4°C. Fibra muscular con mitocondrias vaculizadas o rotas (\rightarrow), leve dilatación del retículo endoplasmático (\star) y miocitos alineados (\rightarrow); vaso con vesículas de pinocitosis en la pared (\rightarrow), y un fibroblasto (\Rightarrow) (7 000x).

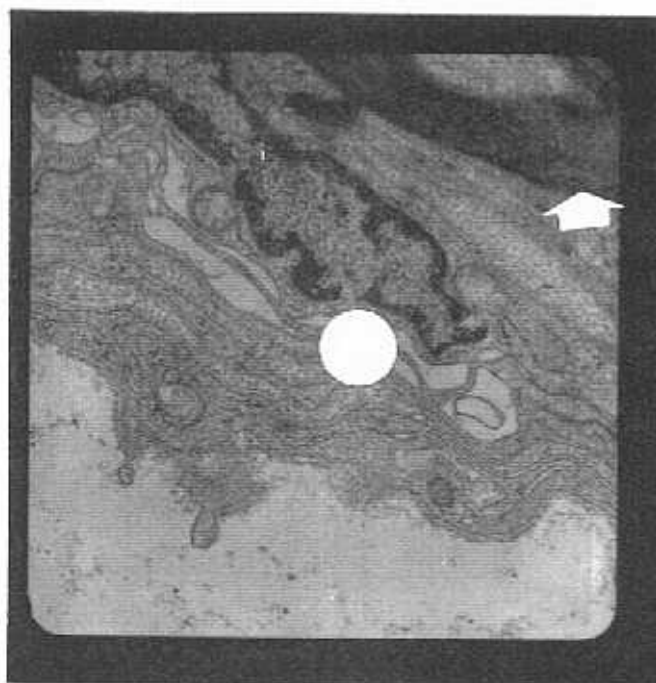


Fig.- 115. Idem. Nervio intramuscular con vaina de mielina alterada (\Rightarrow) y célula de Schwann con su núcleo (\bigcirc) (20 000x).

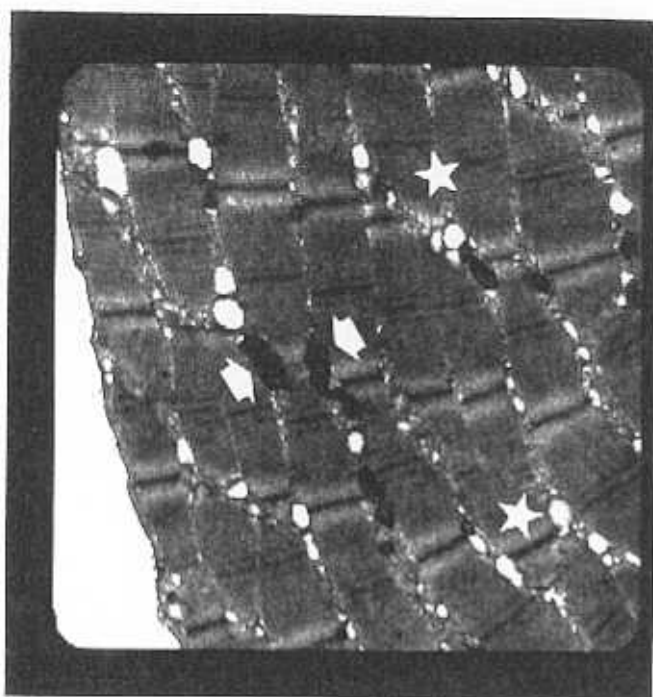


Fig.- 116. Músculo en isquemia de 4 h y perfusión a 10°C. Fibra muscular con mitocondrias bien conservadas (⊙), dilatación del sistema reticular y glucógeno (☆) (12 000x).

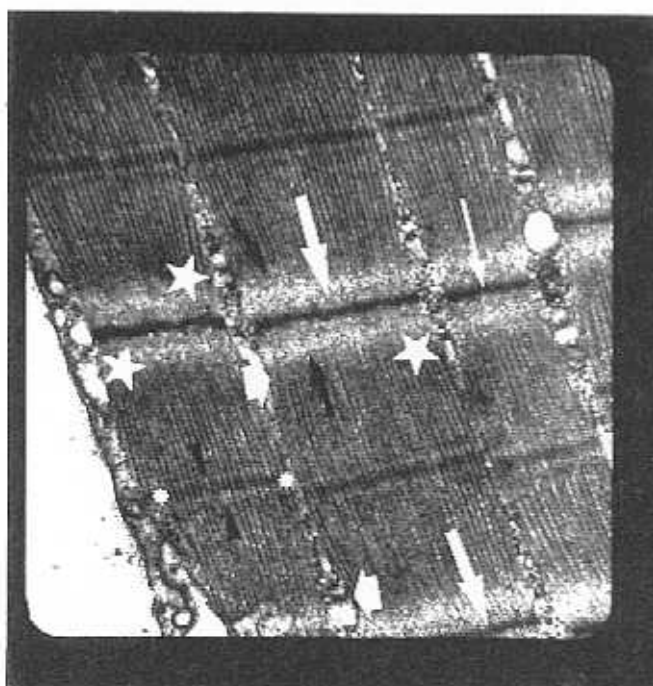


Fig.- 117. Idem. Presencia de una sarcómera (⊙), línea Z (⊙), banda I (⊙), banda A (⊙), banda H (⊙), banda M (⊙) y su sistema reticular (formando una triada en la porción externa) y gránulos de glucógeno (☆) (30 000x).

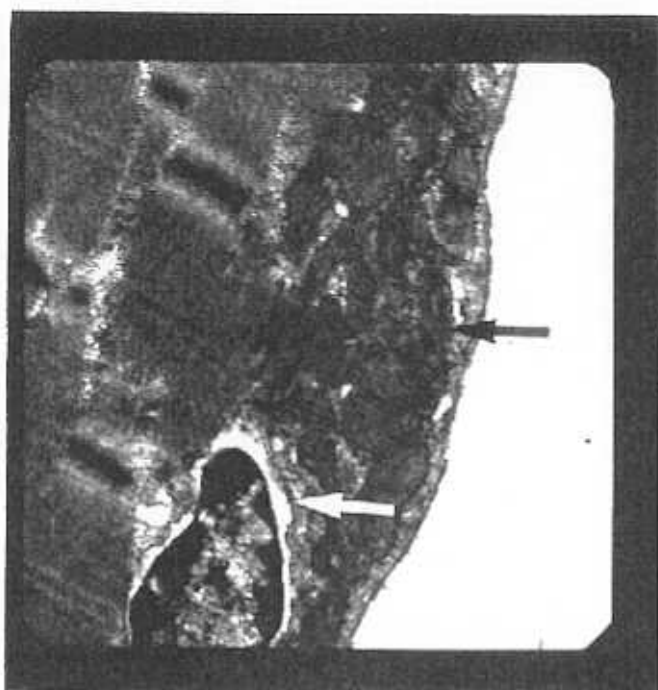


Fig.- 118. Idem. Fibra muscular con acúmulo de mitocondrias normales perinucleares (→) y dilatación de la cisterna perinuclear (⇒) (20 000x).



Fig.- 119. Idem. Nervio intramuscular con vaina de mielina bien conservada (→) y célula de Schwann con su núcleo (♣) (50 000x).

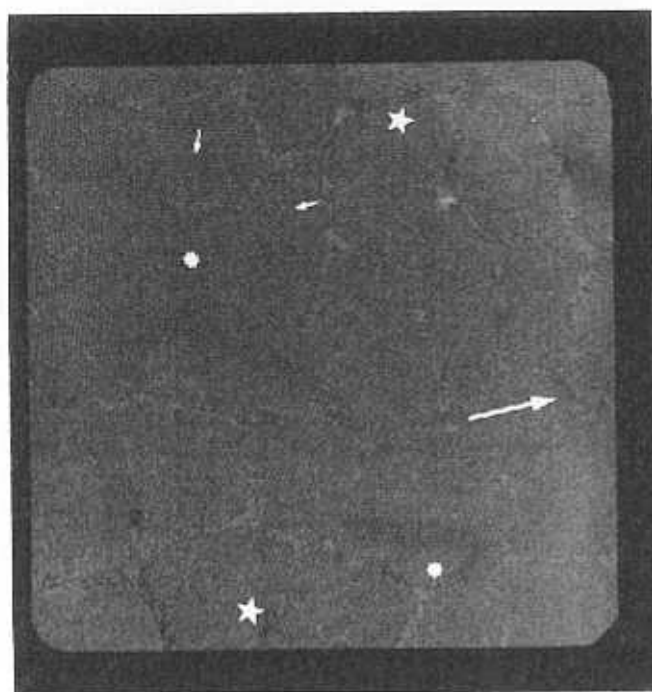


Fig.- 120. Músculo en isquemia de 5 h y perfusión a 20°C. Corte transversal, con la imagen hexagonal de los filamentos de actina y miosina (\leftrightarrow), sistema reticular con mínima dilatación (#) y mitocondrias balonizadas (☆) y alguna bien conservada (\Rightarrow) (20 000x).

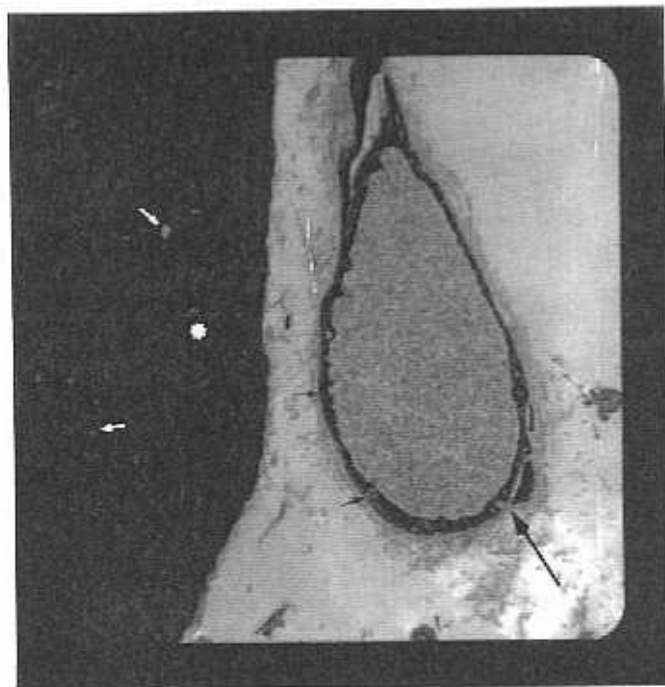


Fig.- 121. Idem. Fibra muscular con mitocondrias balonizadas o rotas (\leftrightarrow) y sistema reticular con leve dilatación (#) ; vaso sanguíneo con destrucción parcial de la pared endotelial (⇨) y vesículas de pinocitosis (\rightarrow) (7 000x).



Fig.- 122. Músculo en isquemia de 5 h y perfusión a 4°C. Fibras musculares rotas (☆), mitocondrias balonizadas y rotas (⇒) y un fibroblasto (⇒) (7 000x).

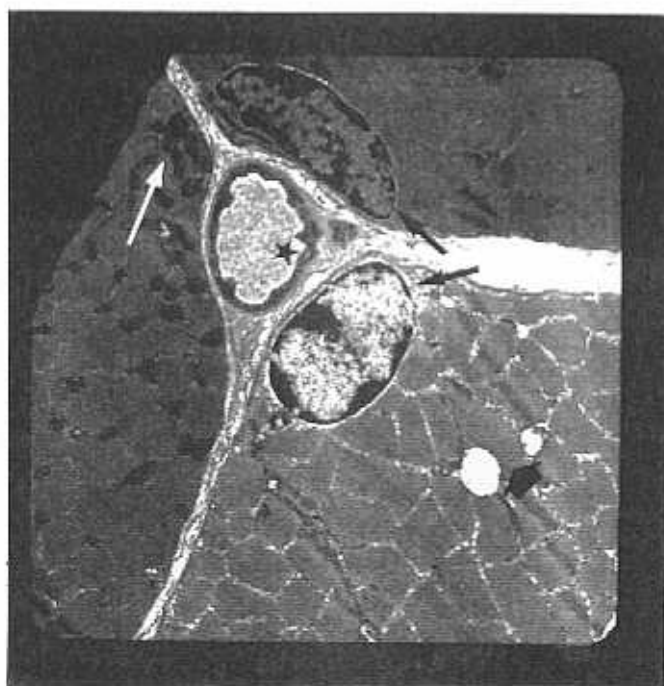


Fig.- 123. Músculo en isquemia de 5 h y perfusión a 10°C. Fibras musculares con retracción de la cisterna perinuclear (⇒), mitocondrias bien conservadas (⇒) y otras balonizadas (⇒); vaso sanguíneo con indentaciones en la pared (★) (7 000x).

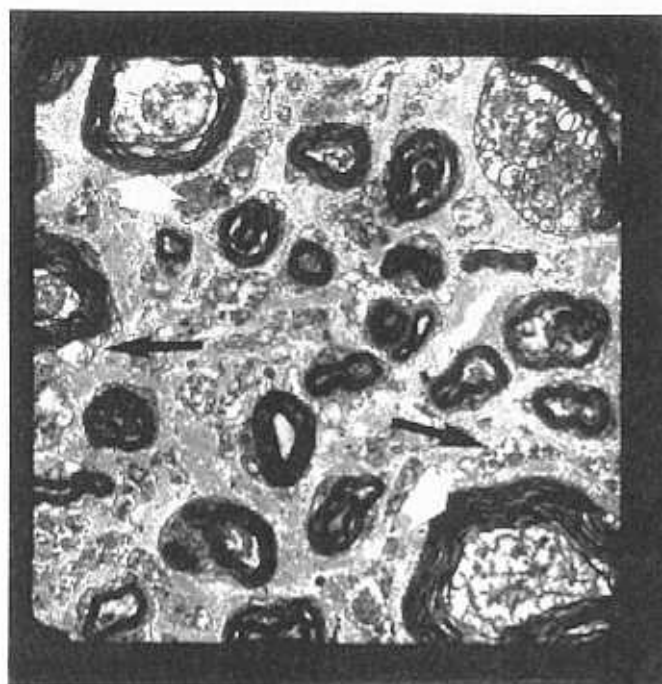


Fig.- 124. Músculo en isquemia de 4 h y perfusión a 20°C. Nervio femoral: homogenizado de la vaina de mielina (↔) y vacuolas en las células de Schwann (→) (3 000x).

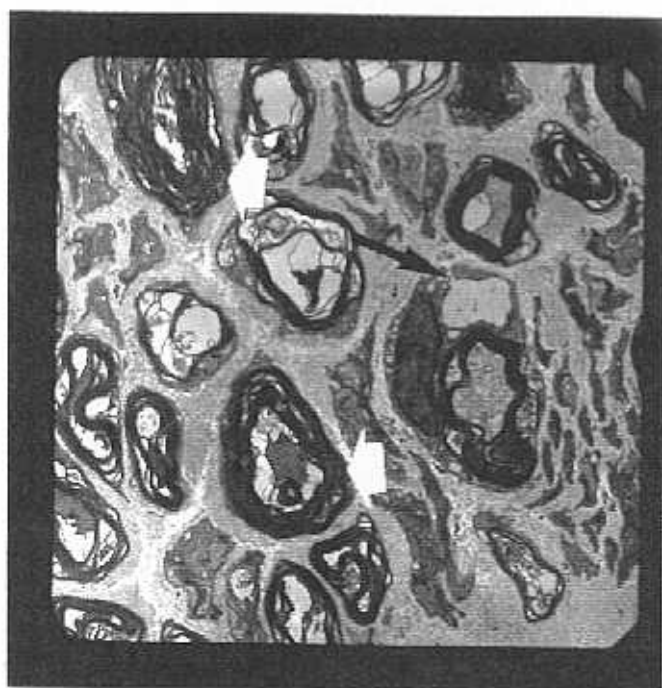


Fig.- 125. Músculo en isquemia de 5 h y perfusión a 20°C. Nervio femoral: dehiscencia y desestructuración de la vaina de mielina (↔) y vacuolización de las células de Schwann (→) (3 000x).

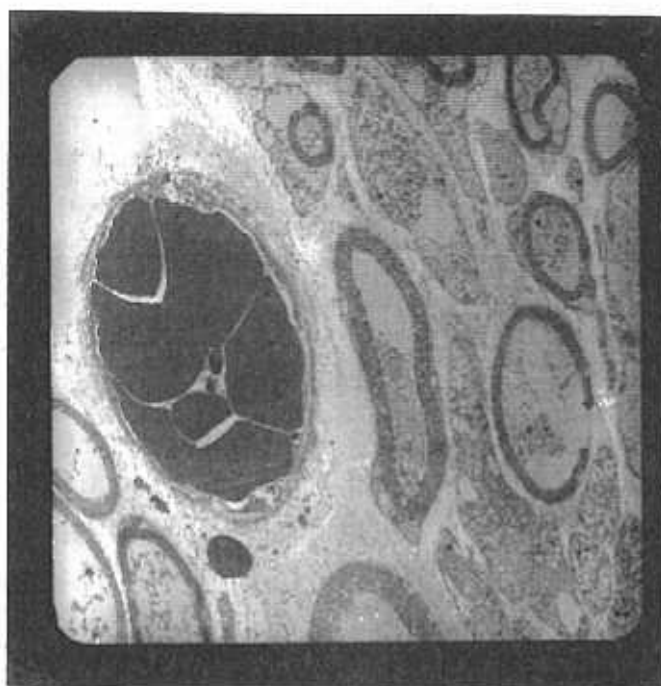


Fig.- 126. Músculo en isquemia de 4 h y perfusión a 4°C. Nervio femoral: cambios degenerativos irreversibles (4 400x).

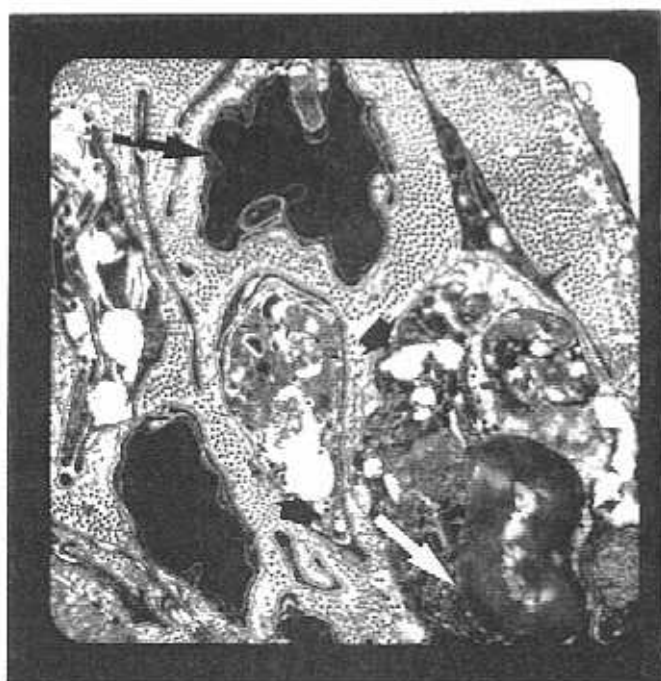


Fig.- 127. Músculo en isquemia de 5 h y perfusión a 4°C. Nervio femoral: cambios degenerativos irreversibles, con homogenizado de la vaina de mielina (→), pycnosis nuclear (→) y vacuolización lipídica de las células de Schwann (♠) (12 000x).

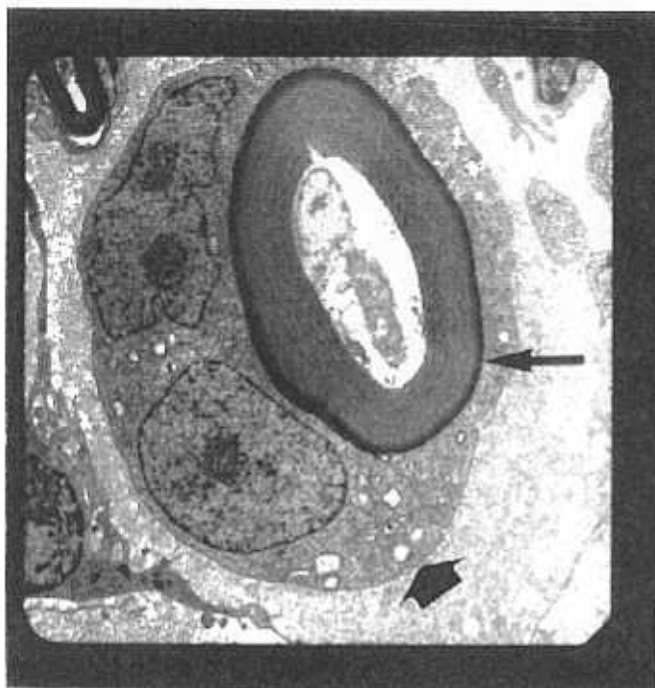


Fig.- 128. Músculo en isquemia de 4 h y perfusión a 10°C. Nervio femoral: vaina de mielina conservada (→) y célula de Schwann normal (♠) (7 000x).



Fig.- 129. Músculo en isquemia de 5 h y perfusión a 10°C. Nervio femoral: vaina de mielina conservada (→) y vacuolas lipídicas en fibras amielínicas (♠) (7 000x).

D.- Nucleótidos de Adenina: estudio con Cromatografía Líquida

Al someter a una extremidad a isquemia, con independencia del tiempo transcurrido, se produce siempre una disminución del ATP y PCr, con aumento de AMP, ADP y Pi. Cuanto menor sea el tiempo de isquemia menor serán las alteraciones y se producirá una mejor recuperación de los distintos valores. Con perfusión a 20°C, los tiempos de isquemia más cortos producen menores variaciones, siendo más manifestadas con tiempos de isquemia de 5 horas, con incapacidad para recuperar los valores del ATP, **Tabla XXII**. La perfusión con suero a 10°C induce las menores variaciones en los valores de los fosfatos con recuperación del ATP, incluso, en isquemias de 5 horas, **Tabla XXIII**. La perfusión con suero a 4°C manifiesta un comportamiento inverso al suero a 20°C, con incapacidad para recuperar los valores finales del periodo de isquemia de 3 horas, no así en las isquemias de 4 y 5 horas, en donde presenta unos valores a la semana del experimento superiores a los finales de la isquemia, **Tabla XXIV**.

Se toman como valores de referencia o basales los valores de los fosfatos hallados al final de cada tiempo de isquemia, para compararlos con los valores que presentan a la semana del experimento.

Se ha hecho de esta manera para evitar, si se obtenían muestras basales al inicio del experimento, que influyeran en la serología y en la histoquímica, alterándolas (como se demostró en los conejos utilizados para mejorar la técnica).

El AMP presenta unos valores al final de los tiempos de isquemia que oscilan entre 2674,98 y 117,85 pmol, con una media total en dicho momento de 1199,96 pmol. La media total es de 1186,33 +/- 113,09 pmol; para la perfusión con suero a 4°C es una media total de 1274,72 pmol, para sueros a 10°C es de 1501,07 pmol y para sueros a 20°C es de 783,22 +/- 195,87 pmol, **Fig.142**.

Con tiempos de isquemia de 3 horas y perfusión a 20°C se produce un ascenso de sus valores desde 385,21 +/- 172 hasta 726,78 +/- 275,91 pmol, **Fig.130 y 139**; al igual que ocurre con la perfusión a 4°C, con una menor elevación, desde 814,91 +/- 714,96 hasta 892,91 +/- 225,64 pmol, **Fig.136 y 139**. Al perfundir con suero a 10°C se produce una disminución de sus valores desde 1991,56 +/- 631,68 hasta 1800 +/- 265,55 pmol, **Fig.133 y 139**. Con tiempos de isquemia de 4 horas se produce una disminución del AMP con los tres métodos de perfusión, entre la cifra del final de la isquemia y la obtenida a la

semana. Con suero a 20°C se produce un descenso desde 686,28 \pm 329,36 hasta 442,15 \pm 227,2 pmol, **Fig.131 y 140**. Con suero a 10°C hay una caída desde 1413,05 \pm 1064,76 hasta 1289,76 \pm 388 pmol, **Fig.134 y 140**. Y con suero a 4°C hay un descenso desde 1430,91 \pm 1216,48 hasta 1164,35 \pm 1119,54 pmol, **Fig.137 y 140**. Al mantener la extremidad 5 horas en isquemia y con perfusión a 20°C se produce un ascenso de los valores desde 1214,75 \pm 832,92 hasta 1244,13 \pm 1075,5 pmol, **Fig.132 y 141**; al igual que con suero a 10°C, que aumenta desde 1083,22 \pm 537,24 hasta 1428,82 \pm 591,86 pmol, **Fig.135 y 141**. Con la perfusión a 4°C se observa una disminución del AMP desde 1779,71 \pm 334,65 hasta 1565,51 \pm 360,63 pmol, **Fig.138 y 141**.

Tomados todos los valores de AMP en conjunto podemos ver como con el suero a 10°C los valores iniciales y finales son similares o superpuestos, hay una disminución de los valores obtenidos a la semana, con respecto a los conseguidos al finalizar el periodo de isquemia, al utilizar suero a 4°C y elevación de esos mismos valores si perfundimos con suero a 20°C, **Fig.142**.

Mediante el análisis de la varianza apreciamos una relación significativa ($p<0,05$) con respecto a la temperatura, no influyendo el momento de la toma ni el tiempo de isquemia, **Tabla XXV y XXVI**. Mediante el test de Kruskal-Wallis se observa una relación muy significativa ($p<0,007$) con respecto a la temperatura de perfusión y poco significativa ($p<0,7$) con respecto al tiempo de isquemia, **Tabla XXVII**.

El ADP ofrece unos valores al final de los tiempos de isquemia que oscilan entre 2090,57 y 17,43 pmol, con una media total en ese momento de 576,57 \pm 86,79 pmol. La media total es de 569,17 \pm 62,43 pmol; para la perfusión con suero a 4°C es de 755,56 pmol, con suero a 10°C es de 576,29 pmol, y con suero a 20°C es de 375,64 \pm 108,13 pmol, **Fig.146**.

Al someter la extremidad a 3 horas de isquemia y perfusión con suero a 20°C y 4°C se produce un ascenso de sus valores a la semana de la isquemia. Con suero a 20°C es desde 223,14 \pm 192,58 hasta 379,64 \pm 366,05 pmol, **Fig.130 y 143**; con suero a 4°C es desde 302,96 \pm 274,06 hasta 1013,96 \pm 281,56 pmol, **Fig.136 y 143**. Con suero a 10°C hay un descenso de sus valores finales de isquemia, 717,69 \pm 152,37 pmol, con respecto a los obtenidos a la semana del experimento, 284,34 \pm 174,58 pmol, **Fig.133 y 143**. Con tiempos de isquemia de 4 horas ocurre el mismo comportamiento. Con suero a 20°C hay un ascenso desde 85,82 \pm 14,48 hasta 302,14 \pm 248,53 pmol, **Fig.131 y 144**, y con suero a

4°C hay un aumento desde 529,15 +/- 262,37 hasta 768,14 +/- 110,89 pmol, **Fig.137 y 144**. Utilizando suero a 10°C se produce un descenso desde 681,96 +/- 66,93 hasta 495,99 +/- 198,12 pmol, **Fig.134 y 144**. Al mantener la extremidad en isquemia de 5 horas se produce un descenso de los valores, con respecto a los iniciales la semana, con los tres tipos de perfusión. Con suero a 20°C es desde 870,07 +/- 864,88 hasta 393,06 +/- 219,07 pmol, **Fig.132 y 145**. Con suero a 10°C es desde 676,25 +/- 236,12 hasta 601,54 +/- 338,78 pmol, **Fig.135 y 145**. Y con suero a 4°C hay un descenso desde 1102,09 +/- 904,36 hasta 817,05 +/- 542,93 pmol, **Fig.138 y 145**.

Al tomar todos los valores de ADP en conjunto observamos como con la perfusión con suero a 10°C se produce una disminución importante de los valores obtenidos a la semana con respecto a los conseguidos al final de la isquemia, al igual que al utilizar suero a 20°C, pero su descenso es mucho menor. La utilización de suero a 4°C produce un ascenso de los valores de ADP a la semana del experimento, **Fig.146**.

Mediante el análisis de la varianza obtenemos una relación significativa ($p<0,07$) con respecto a la temperatura y una relación significativa ($p<0,08$) teniendo en cuenta el momento de la toma, el tiempo de isquemia y la temperatura de perfusión, **Tabla XXVIII y XXIX**. Utilizando el test de Kruskal-Wallis se aprecia una relación muy significativa ($p<0,003$) con respecto a la temperatura de perfusión y casi significativa ($p<0,1$) con respecto al tiempo de isquemia, **Tabla XXX**.

Los valores de ATP varían al final de los periodos de isquemia entre 14931,3 y 48,8 pmol, con una media total para dichos periodos de 2376,87 +/- 538,74 pmol. La media total es de 2662,11 +/- 572,3 pmol; para la perfusión con suero a 4°C es de 1160,61 pmol; para el suero a 10°C es de 5668,12 pmol, y para suero a 20°C es de 1157,61 +/- 991,26 pmol, **Fig.150**.

Los periodos de isquemia de 3 horas y perfusión a 20°C y 10°C presentan una elevación de sus cifras de ATP al cabo de una semana, apreciando un descenso al utilizar suero a 4°C. Con suero a 20°C aumenta desde 557,92 +/- 567,56 hasta 2569,49 +/- 3821,97 pmol, **Fig.130 y 147**; con suero a 10°C aumenta desde 8803,73 +/- 6608,66 hasta 9530,49 +/- 5103,79 pmol, **Fig.133 y 147**; con suero a 4°C hay un descenso desde 1455,58 +/- 1590,54 hasta 1207,84 +/- 1278,03 pmol, **Fig.136 y 147**. Al provocar isquemias de 4 y 5 horas observamos como la perfusión con suero a 10°C y 4°C presentan un aumento de los valores del ATP a la semana del experimento y se aprecia una disminución al utilizar suero a 20°C.

Con isquemias de 4 horas y perfusión a 20°C hay una caída desde 228,53 +/- 69,47 hasta 183,785 +/- 100,39 pmol, **Fig.131 y 148**. Con suero a 10°C aumenta desde 4496,38 +/- 4363,5 hasta 6811,63 +/- 7526 pmol, **Fig.134 y 148**. El suero a 4°C produce un aumento desde 686,06 +/- 411,62 hasta 1034,13 +/- 186,5 pmol, **Fig.137 y 148**. Con isquemia de 5 horas y utilizando suero a 20°C para la perfusión hay un descenso desde 2450,87 +/- 1890,45 hasta 955,05 +/- 829,9 pmol, **Fig.132 y 149**. Con suero a 10°C hay un aumento desde 1558,77 +/- 812,23 hasta 2807,73 +/- 1470,51 pmol, **Fig.135 y 149**. El suero a 4°C produce un ascenso de los valores desde 1154 +/- 744,73 hasta 1426,04 +/- 791,07 pmol, **Fig.138 y 149**.

Al tomar en conjunto todos los valores de ATP observamos que con la perfusión a 10°C se producen los mayores ascensos de ATP, al cabo de una semana, con un menor ascenso para las extremidades perfundidas con suero a 20°C y el menor aumento, aunque próximo al anterior, se produce al utilizar sueros a 4°C, **Fig.150**.

En el análisis de la varianza observamos una relación muy significativa ($p < 0,006$) con respecto a la temperatura de perfusión, sin influir el momento de la toma ni el tiempo de isquemia, **Tabla XXXI y XXXII**. En el test de Kruskal-Wallis hay una relación muy significativa ($p < 0,00003$) con la temperatura de perfusión y casi significativa ($p < 0,5$) con el tiempo de isquemia, **Tabla XXXIII**.

Al relacionar todas las mediciones obtenidas a la semana del experimento, comprobamos como la perfusión con suero a 10°C mantiene los valores del AMP, reduce los valores del ADP y aumenta de manera espectacular los valores del ATP, por la utilización del AMP y del ADP en la producción del ATP. La utilización de sueros a 20°C induce una elevación de los valores del AMP, una disminución del ADP y una moderada elevación del ATP, por una menor disponibilidad de AMP y ADP. Utilizando sueros a 4°C se aprecia una disminución de los valores del AMP después de una semana de la isquemia, con aumentos del ADP y un mínima elevación del ATP, por un defecto en la capacidad de utilizar el AMP y el ADP para producir ATP, **Fig.142,146 y 150**.

TABLA - XXII: NUCLEÓTIDOS DE ADENINA MEDIANTE HPLC (VALORES OBTENIDOS A UNA TEMPERATURA DE 20 ° C, +/- 1° C)

Tiempo	NUCLEÓTIDOS DE ADENINA MEDIANTE HPLC							
			AMP		ADP		ATP	
			p mol	%	p mol	%	p mol	%
3h	C5	Basal	564,258	51,91	120,438	11,08	354,577	45,88
		Final	498,712	45,88	164,027	15,09	383,491	35,28
	C6	Basal	371,816	62,43	103,693	17,41	120,046	20,16
		Final	648,152	55,73	172,602	14,84	342,316	29,43
	C16	Basal	219,584	10,03	445,311	20,28	1199,143	65,47
		Final	1033,477	9,65	802,301	7,04	6982,662	77,03
4h	C8	Basal	569,056	59,25	102,263	10,65	289,169	30,11
		Final	704,008	72,49	135,260	13,93	131,921	13,58
	C10	Basal	1058,224	76,56	80,232	5,80	243,717	17,63
		Final	297,225	49,49	183,387	30,54	119,932	19,97
	C11	Basal	431,570	65,46	74,967	11,37	152,721	23,17
		Final	325,236	26,82	587,783	48,48	299,502	24,70
5h	C9	Basal	1790,584	76,24	139,941	5,96	418,006	17,80
		Final	2341,069	77,76	166,809	5,54	502,823	16,70
	C25	Basal	1593,979	21,07	1825,229	25,19	2778,527	42,14
		Final	1199,932	48,48	408,227	15,01	449,493	21,08
	C29	Basal	259,694	3,51	645,043	9,29	4156,090	67,01
		Final	191,414	3,94	604,170	13,43	1912,849	47,25

Cn: Número de conejo utilizado.

NUCLEÓTIDOS DE ADENINA (HPLC) A 20 ° C

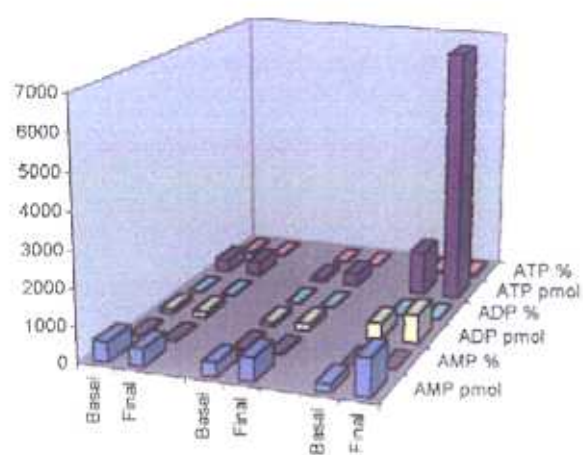


Fig.- 130. Tiempo: 3h

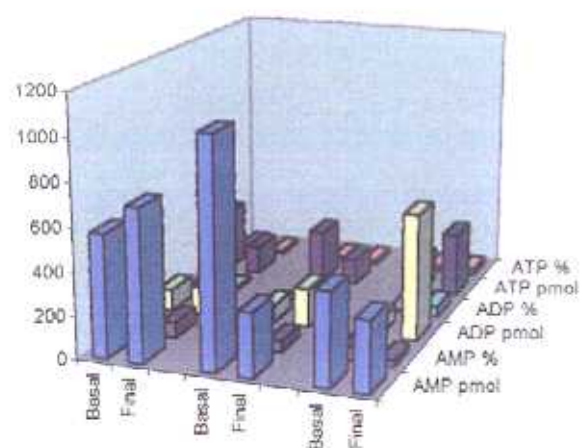


Fig.- 131. Tiempo: 4h

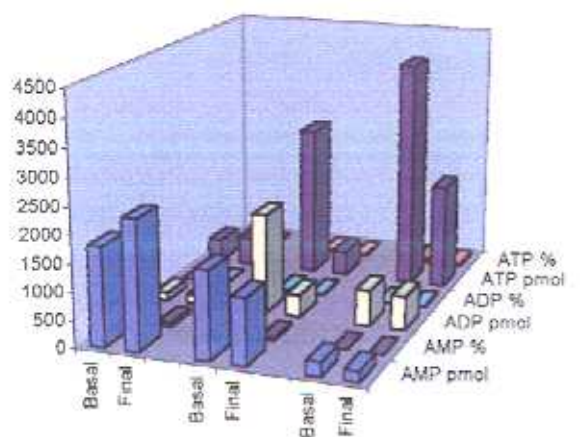


Fig.- 132. Tiempo: 5h

**TABLA - XXIII: NUCLEÓTIDOS DE ADENINA MEDIANTE HPLC
(VALORES OBTENIDOS A UNA TEMPERATURA DE 10 ° C, +/- 1 ° C)**

Tiempo	NUCLEÓTIDOS DE ADENINA MEDIANTE HPLC							
			AMP		ADP		ATP	
			p mol	%	p mol	%	p mol	%
3h	C12	Basal	2674,982	14,42	860,743	4,64	14931,3	80,49
		Final	2038,700	10,99	245,141	1,12	13720,8	86,51
	C14	Basal	1429,095	10,61	557,446	3,85	9678,74	84,42
		Final	1513,966	10,38	132,693	0,66	11024,2	88,70
	C20	Basal	1870,617	38,42	734,900	14,21	1801,16	43,17
		Final	1847,354	25,69	475,199	6,05	3846,49	62,57
4h	C13	Basal	1431,164	10,27	684,735	4,63	9325,38	78,60
		Final	1618,682	7,82	300,008	1,27	15222,9	86,23
	C15	Basal	339,345	6,76	747,463	14,89	3327,19	66,28
		Final	861,861	11,49	696,194	8,77	4497,85	70,61
	C23	Basal	2468,648	59,57	613,682	13,77	836,594	23,26
		Final	1388,762	43,35	491,772	14,15	714,187	25,97
5h	C26	Basal	1673,172	42,78	875,066	23,16	826,443	23,59
		Final	1822,185	46,59	270,102	7,96	1240,89	35,42
	C28	Basal	622,116	16,38	415,262	14,07	2432,38	49,75
		Final	748,144	12,47	587,309	10,74	3024,46	61,86
	C30	Basal	954,372	25,19	738,435	20,21	1417,5	42,66
		Final	1716,143	20,31	947,232	11,61	4157,86	56,65

Cn: Número de conejo utilizado.

NUCLEÓTIDOS DE ADENINA (HPLC) A 10 ° C

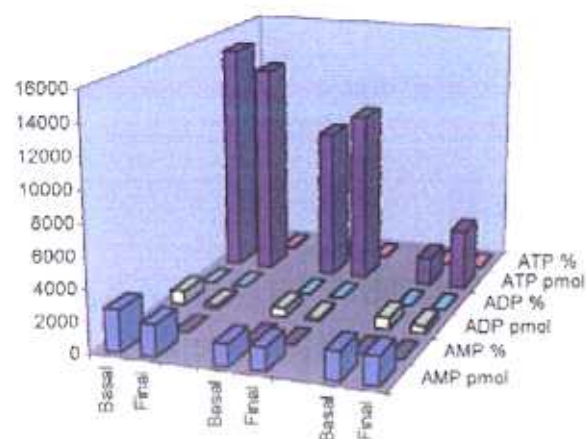


Fig.- 133. Tiempo: 3h

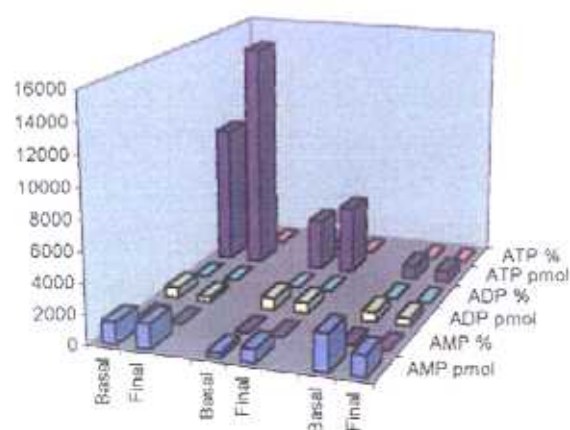


Fig.- 134. Tiempo: 4h

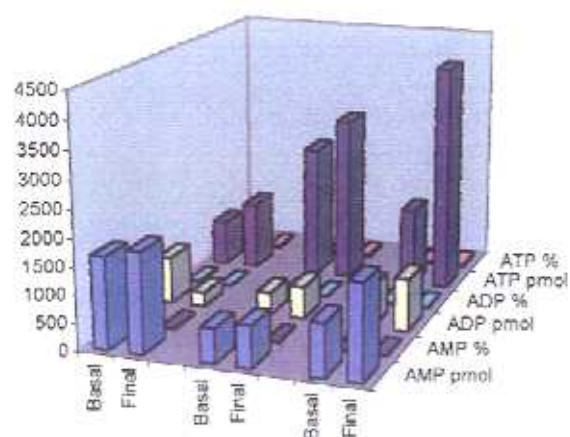


Fig.- 135. Tiempo: 5h

**TABLA - XXIV: NUCLEÓTIDOS DE ADENINA MEDIANTE HPLC
(VALORES OBTENIDOS A UNA TEMPERATURA DE 4° C, +/- 1 ° C)**

Tiempo	NUCLEÓTIDOS DE ADENINA MEDIANTE HPLC							
			AMP		ADP		ATP	
			p mol	%	p mol	%	p mol	%
3h	C17	Basal	117,856	64,02	17,434	9,47	48,803	26,51
		Final	634,496	24,89	961,970	38,22	328,688	15,72
	C19	Basal	1546,531	26,28	327,536	4,93	3181,499	63,35
		Final	993,332	11,65	1317,907	16,15	2673,909	36,10
	C21	Basal	780,362	23,11	563,912	15,74	1136,439	39,83
		Final	1050,926	33,27	762,028	25,00	620,924	20,37
4h	C18	Basal	215,285	7,05	770,033	26,11	732,521	30,54
		Final	128,391	4,10	824,799	29,60	848,852	37,39
	C22	Basal	2648,249	55,91	567,837	11,08	1072,486	26,19
		Final	1012,661	25,28	640,364	15,09	1221,828	35,88
	C24	Basal	1429,217	74,53	249,586	11,10	253,184	11,26
		Final	2352,006	47,20	839,273	17,39	1031,721	23,25
5h	C27	Basal	1653,650	40,40	899,499	22,75	823,019	22,44
		Final	1696,509	33,87	514,961	10,51	1182,174	26,65
	C31	Basal	1526,408	53,14	316,210	9,17	632,147	24,08
		Final	1157,690	36,34	492,348	14,30	785,620	28,84
	C32	Basal	2159,097	29,31	2090,579	29,61	2006,859	31,08
		Final	1842,341	25,01	1443,848	20,45	2310,342	35,78

Cn: Número de conejo utilizado.

NUCLEÓTIDOS DE ADENINA (HPLC) A 4 ° C

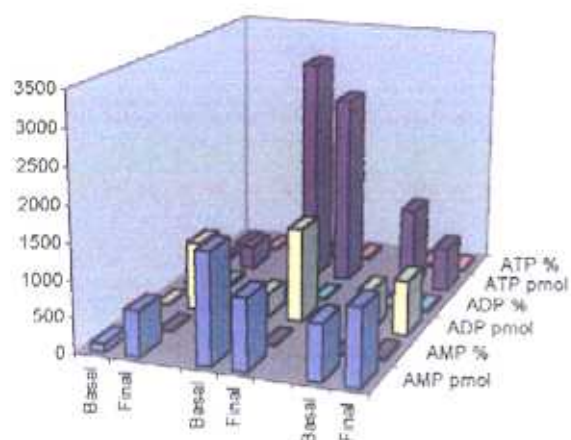


Fig.- 136. Tiempo: 3h

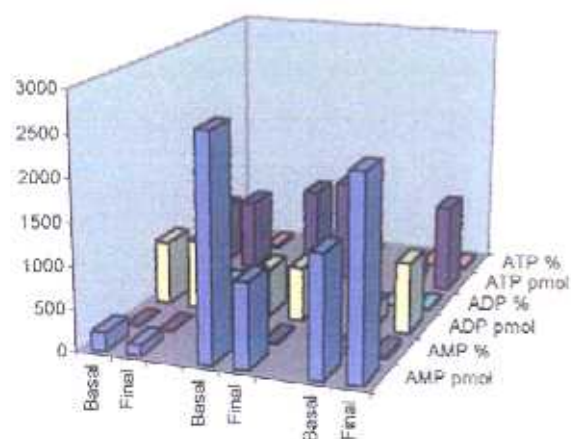


Fig.- 137. Tiempo: 4h

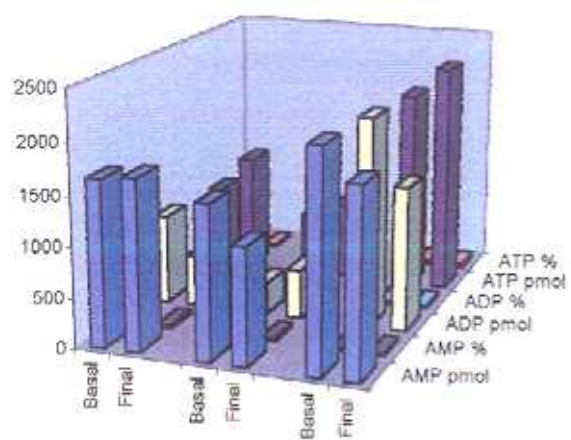


Fig.- 138. Tiempo: 5h

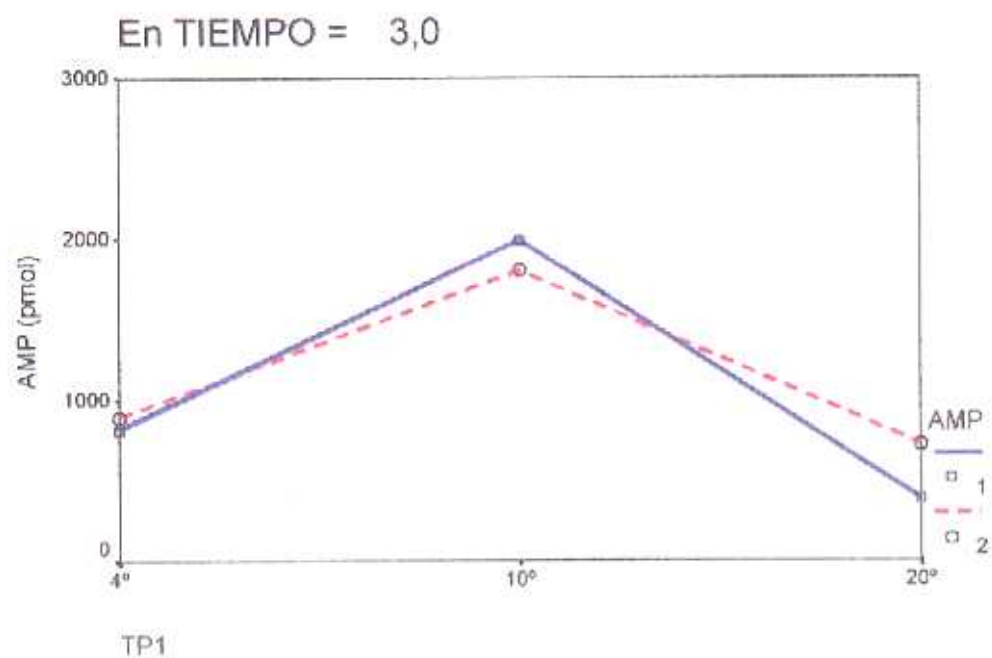


Fig.- 139. Isquemia de 3 h.

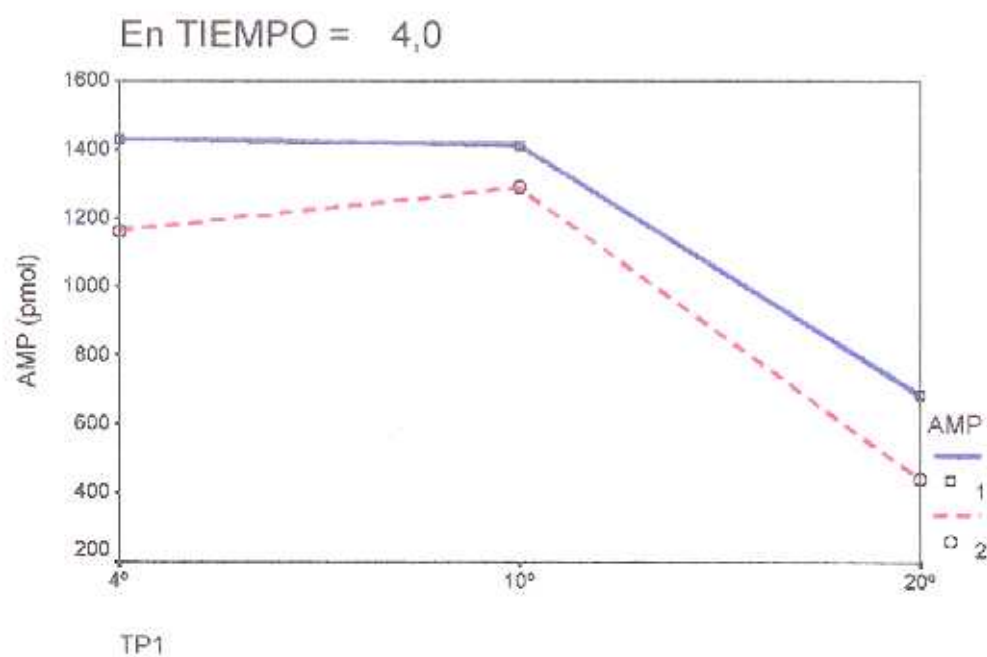


Fig.- 140. Isquemia de 4 h.

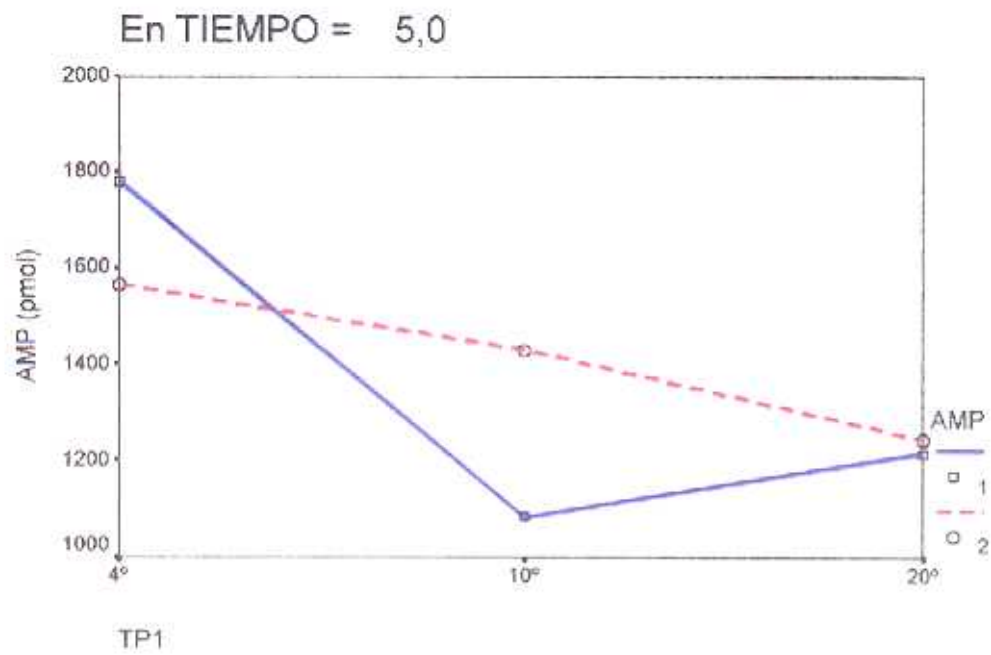


Fig.- 141. Isquemia de 5 h.

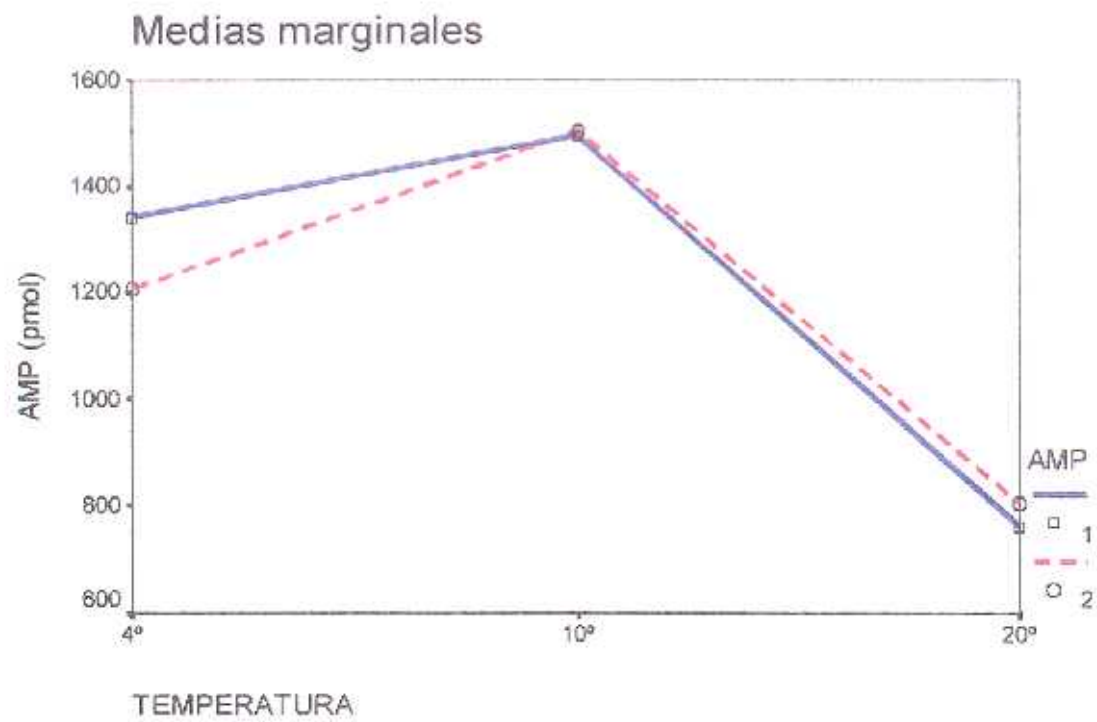


Fig.- 142. Temperaturas de perfusión.

TABLA – XXV: Pruebas de efectos intra-sujetos.

Medida:

Esfericidad asumida

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
AMP	10019,335	1	10019,335	,049	,827	,049	,055
AMP * TIEMPO	229861,999	2	114930,999	,565	,578	1,130	,129
AMP * TP1	79606,368	2	39803,184	,196	,824	,391	,076
AMP * TIEMPO * TP1	387740,651	4	96935,163	,476	,753	1,906	,137
Error(AMP)	3662032,723	18	203446,262				

a. Calculado con alfa = ,05

TABLA – XXVI: Pruebas de los efectos inter-sujetos

Medida:

Variable transformada: Promedio

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
Intercept	37999804,833	1	37999804,833	110,044	,000	110,044	1,000
TIEMPO	542592,869	2	271296,435	,786	,471	1,571	,163
TP1	2424352,753	2	1212176,376	3,510	,052	7,021	,579
TIEMPO * TP1	2076033,118	4	519008,280	1,503	,243	6,012	,371
Error	6215636,493	18	345313,138				

a. Calculado con alfa = ,05

TABLA- XXVII: TEST DE KRUSKAL-WALLIS DE AMP**1.- TEMPERATURA**

TEMPERATURA	MUESTRA	RANGO
4°C	18	29.16
10°C	18	34.72
20°C	18	18.61

Nivel de Significación: 0,0076

2.- TIEMPO

TIEMPO	MUESTRA	RANGO
3 h	9	24.11
FINAL	27	27.66
4 h	9	26.11
5 h	9	31.77

Nivel de Significación: 0,76

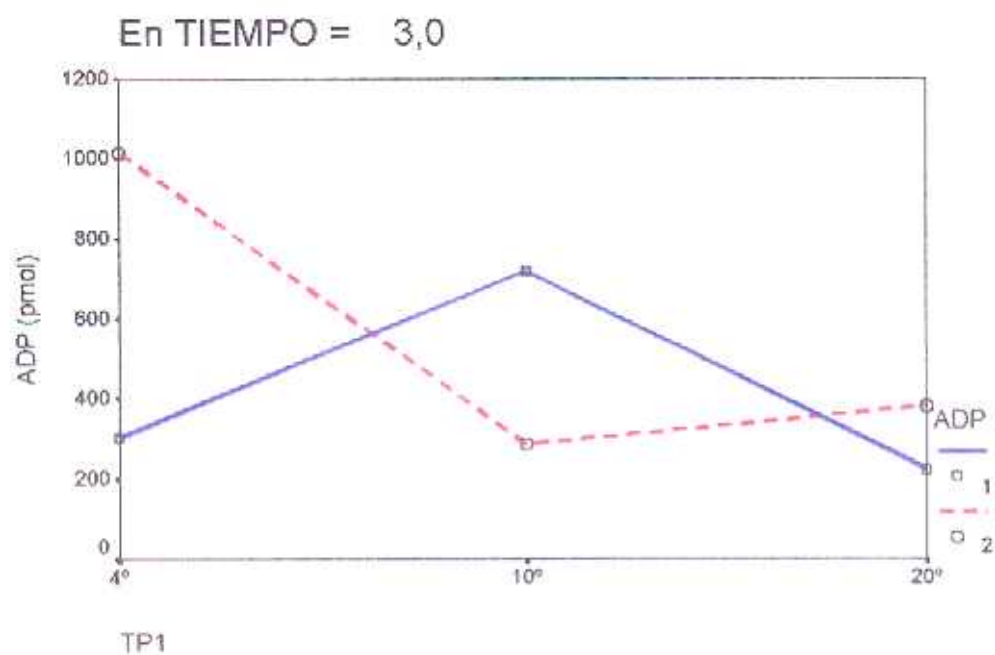


Fig.- 143. Isquemia de 3 h.

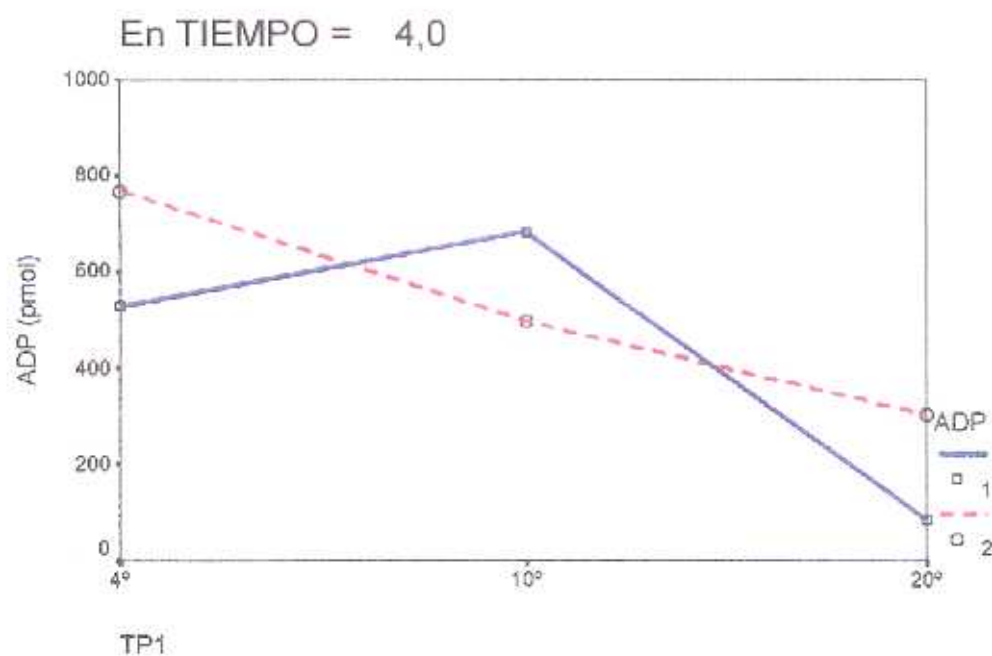


Fig.- 144. Isquemia de 4 h.

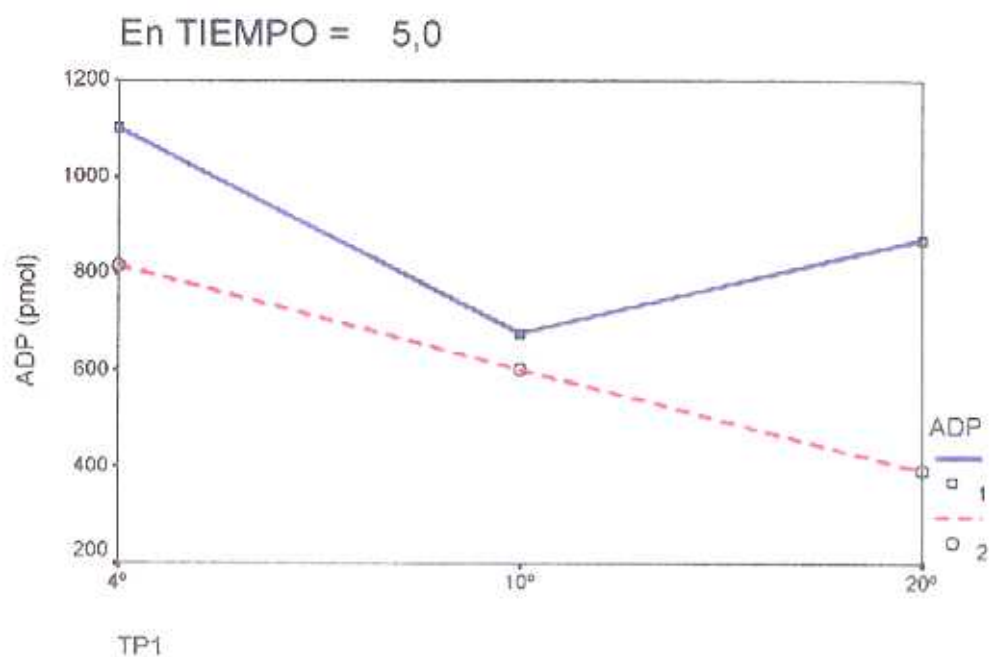


Fig.- 145. Isquemia de 5 h.

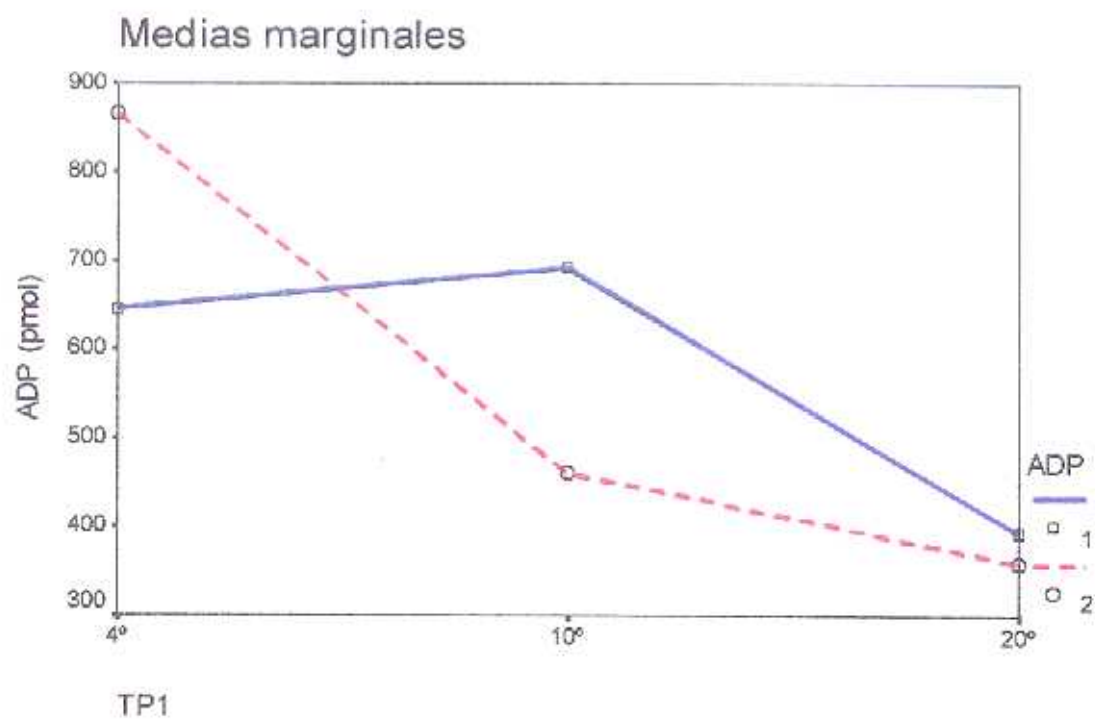


Fig.- 146. Temperaturas de perfusión.

TABLA – XXVIII: Pruebas de efectos intra-sujetos.

Medida:

Esfericidad asumida

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
ADP	2959,423	1	2959,423	,035	,853	,035	,054
ADP * TIEMPO	477635,917	2	238817,959	2,862	,083	5,724	,490
ADP * TP1	464388,792	2	232194,396	2,783	,089	5,565	,478
ADP * TIEMPO * TP1	811030,939	4	202757,735	2,430	,085	9,720	,575
Error(ADP)	1501972,157	18	83442,898				

a. Calculado con alfa = ,05

TABLA – XXIX: Pruebas de los efectos inter-sujetos

Medida:

Variable transformada: Promedio

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
Intercept	8746776,323	1	8746776,323	83,115	,000	83,115	1,000
TIEMPO	409991,934	2	204995,967	1,948	,171	3,896	,350
TP1	650189,897	2	325094,949	3,089	,070	6,178	,522
TIEMPO * TP1	118721,809	4	29680,452	,282	,886	1,128	,098
Error	1894259,074	18	105236,615				

a. Calculado con alfa = ,05

TABLA- XXX: TEST DE KRUSKAL-WALLIS DE ADP**1.- TEMPERATURA**

TEMPERATURA	MUESTRA	RANGO
4°C	18	34.55
10°C	18	30.22
20°C	18	17.72

Nivel de Significación: 0,0038

2.- TIEMPO

TIEMPO	MUESTRA	RANGO
3 h	9	21.33
FINAL	27	28.33
4 h	9	22.66
5 h	9	36.00

Nivel de Significación: 0,17

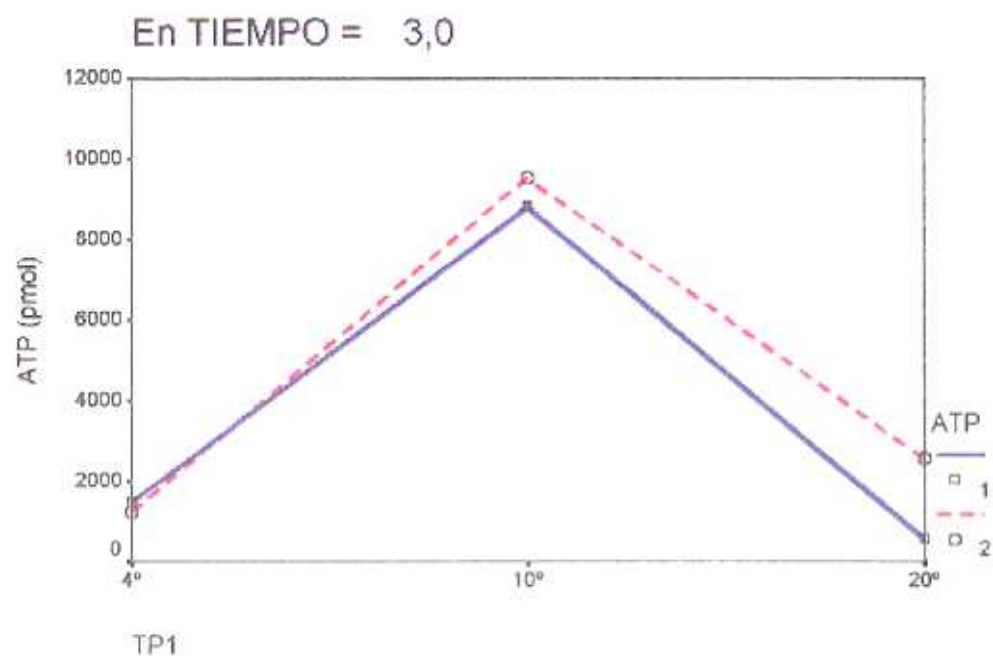


Fig.- 147. Isquemia de 3 h.

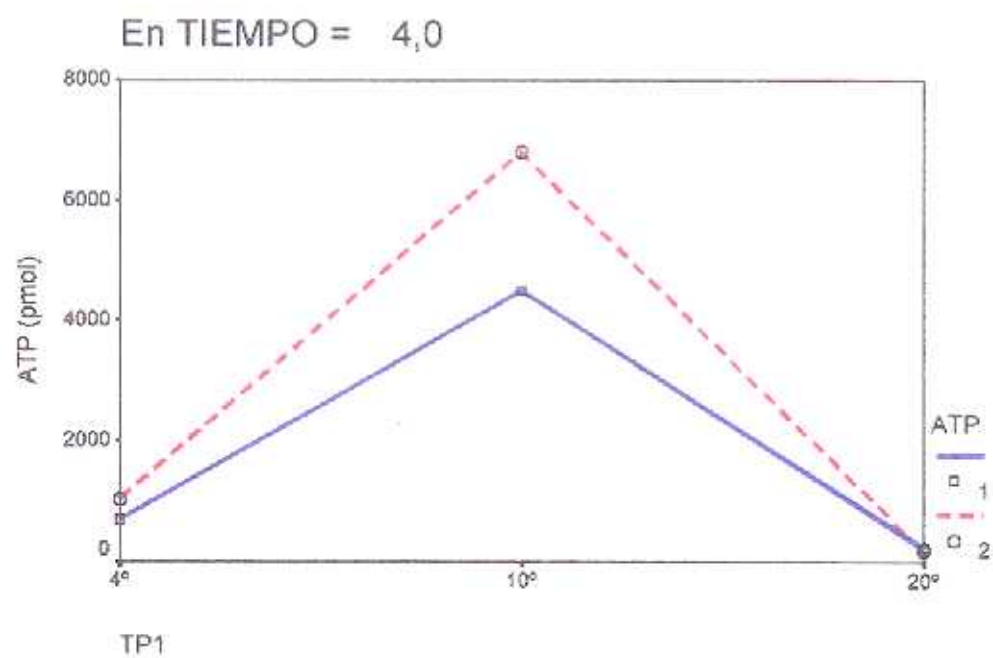


Fig.- 148. Isquemia de 4 h.

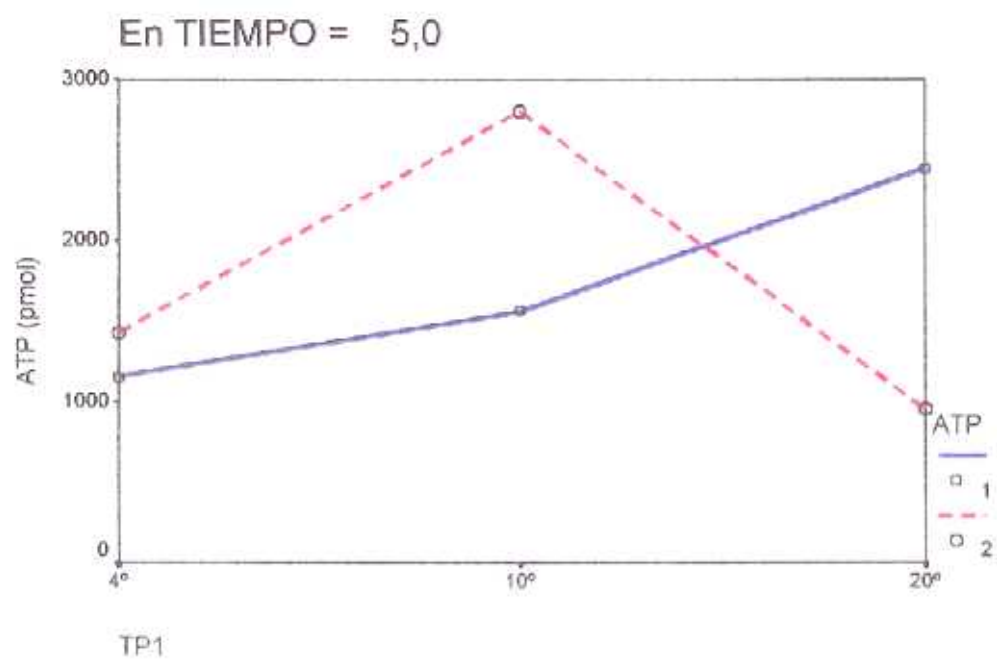


Fig.- 149. Isquemia de 5 h.

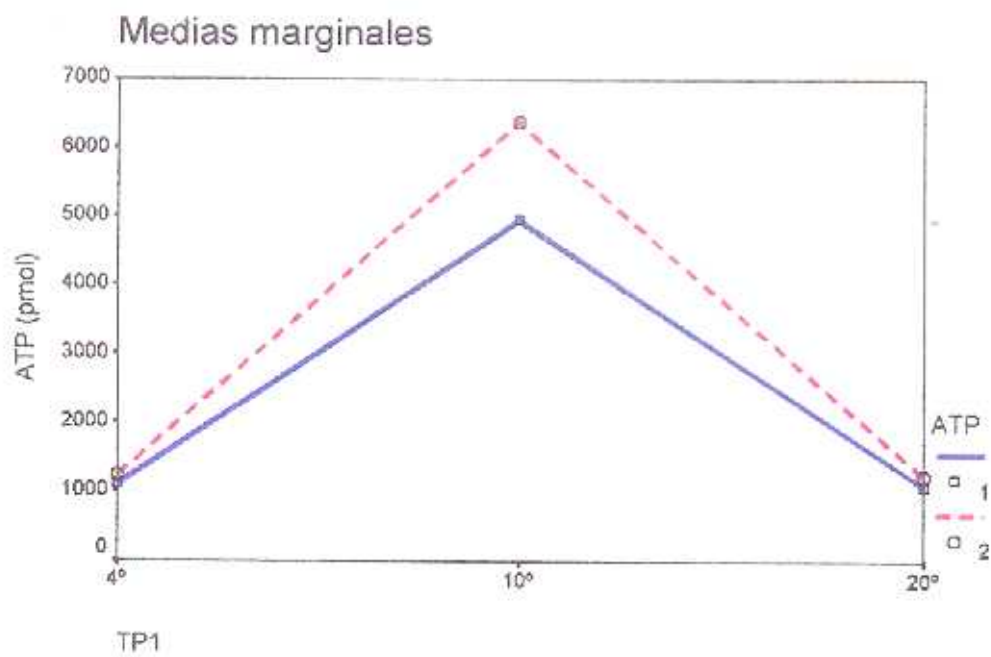


Fig.- 150. Temperaturas de perfusión.

TABLA – XXXI: Pruebas de efectos intra-sujetos.

Medida:

Esfericidad asumida

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
ATP	4393583,097	1	4393583,097	2,866	,108	2,866	,361
ATP * TIEMPO	2136715,138	2	1068357,569	,697	,511	1,394	,149
ATP * TP1	4992921,006	2	2496460,503	1,628	,224	3,256	,298
ATP * TIEMPO * TP1	9463130,676	4	2365782,669	1,543	,232	6,172	,381
Error(ATP)	27598636,252	18	1533257,570				

a. Calculado con alfa = ,05

TABLA – XXXII: Pruebas de los efectos inter-sujetos

Medida:

Variable transformada: Promedio

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
Intercept	191345356,305	1	191345356,305	21,637	,000	21,637	,992
TIEMPO	26114889,682	2	13057444,841	1,477	,255	2,953	,274
TP1	121987425,341	2	60993712,670	6,897	,006	13,794	,872
TIEMPO * TP1	51559193,501	4	12889798,375	1,458	,256	5,830	,361
Error	159181827,796	18	8843434,878				

a. Calculado con alfa = ,05

TABLA- XXXIII: TEST DE KRUSKAL-WALLIS DE ATP**1.- TEMPERATURA**

TEMPERATURA	MUESTRA	RANGO
4°C	18	24.22
10°C	18	40.72
20°C	18	17.55

Nivel de Significación: 0,000032

2.- TIEMPO

TIEMPO	MUESTRA	RANGO
3 h	9	28.11
FINAL	27	28.66
4 h	9	21.00
5 h	9	29.88

Nivel de Significación: 0,59

E.- Nucleótidos de Adenina: estudio con Resonancia Magnética

Los resultados obtenidos están representados en gráficos, desde la **Fig.151** hasta la **Fig.170**.

Las dos primeras figuras son la representación, mediante de la resonancia magnética, de los fosfatos ricos en energía del músculo gastrocnemio: el medial, **Fig.151**, y el lateral, **Fig.152**. En ambos se aprecian los tres picos del ATP: pico beta (entre -10 y -20 ppm), el alfa (entre -5 y -10 ppm) y el gamma (entre 0 y -5 ppm), el pico de PCr, que se toma como referencia (en 0 ppm) y el pico del Pi y los compuestos PME y PDE (entre +5 y +10 ppm).

Para el estudio del ATP, el pico beta nos servirá de referencia principal para observar su presencia o ausencia, ya que los picos alfa y gamma del ATP se superponen a los picos alfa y beta del ADP, y a los picos de otros compuestos, entre ellos el DAN.

Al finalizar el periodo de isquemia de 3 horas, los músculos gastrocnemios mediales presentan una importante deplección del ATP (pico beta disminuido), ausencia de PCr y aumento del Pi y los compuestos PME y PDE, con los tres métodos de perfusión, **Fig.153,155 y 157**, con mejor recuperación del ATP a la semana con sueros a 20°C, **Fig.154**, y 10°C, **Fig.156**, y una menor recuperación con sueros a 4°C, **Fig.158**. Después de haber mantenido tiempos de isquemia de 4 horas apreciamos un descenso importante del ATP al perfundir con sueros a 20°C, **Fig.159**, y a 4°C, **Fig.163**, con menor pérdida con suero a 10°C, **Fig.161**. La pérdida del PCr y el aumento del Pi es similar, con mayor aumento de los PME y PDE al utilizar sueros a 4°C y 20°C. La recuperación del ATP a la semana se produce en los tres grupos de perfusión, siendo mínima al perfundir con suero a 20°C y persistencia de los PME y PDE, **Fig.160**, y una recuperación franca del ATP al utilizar sueros a 10°C, **Fig.162**, y 4°C, en donde persisten los compuestos PME y PDE, **Fig.164**. Al someter una extremidad a 5 horas de isquemia se producen las mayores alteraciones en los compuestos ricos en fosfatos y una menor recuperación del ATP que con tiempos inferiores. Con suero a 20°C se aprecian los tres picos del ATP, aumento del Pi y un gran aumento de los PME y PDE, **Fig.165**. El suero perfundido a 4°C presenta un gráfico con ausencia de pico beta del ATP valorable y aumento del Pi y PME y PDE, **Fig.169**. Con suero a 10°C los 3 picos del ATP están disminuidos pero son apreciables, ausencia de PCr y aumentos del Pi y PME y PDE, **Fig.167**. A la semana, en la extremidad perfundida con suero a 20°C no se aprecian picos valorables de ATP y PCr (posibles pico beta a -8 ppm, gamma a -7 ppm y alfa a -2

ppm, con PCr en 0 ppm), con persistencia del Pi y gran cantidad de PME y PDE, **Fig.166**. Con suero a 4°C aparecen los tres picos del ATP, persistencia de Pi y PME y PDE, **Fig.170**. La extremidad perfundida con suero a 10°C presenta la mejor recuperación del ATP, con sus tres picos claros, presencia de PCr, con persistencia de Pi y menor de PME y PDE, **Fig.168**.

Con los resultados gráficos obtenidos con la RMN se puede apreciar que la perfusión con suero a 10°C produce menores alteraciones y una mejor recuperación de los compuestos ricos en fosfato, en comparación con la perfusión realizada con sueros a 4°C y 20°C.

Si comparamos los resultados cuantificados obtenidos mediante HPLC y los resultados gráficos conseguidos mediante la RMN, podemos comprobar que son muy parecidos o similares. En ambos, la perfusión mediante la técnica de la hipotermia intermedia, suero a 10°C, consigue los mejores resultados, con un comportamiento de los músculos perfundidos con suero a 20°C y 4°C muy parecido, con resultados algo superiores al utilizar suero a 20°C en tiempos de isquemia de 3 horas, pero se invierte con periodos de isquemia de 4 y 5 horas, teniendo leve predominio el suero a 4°C.

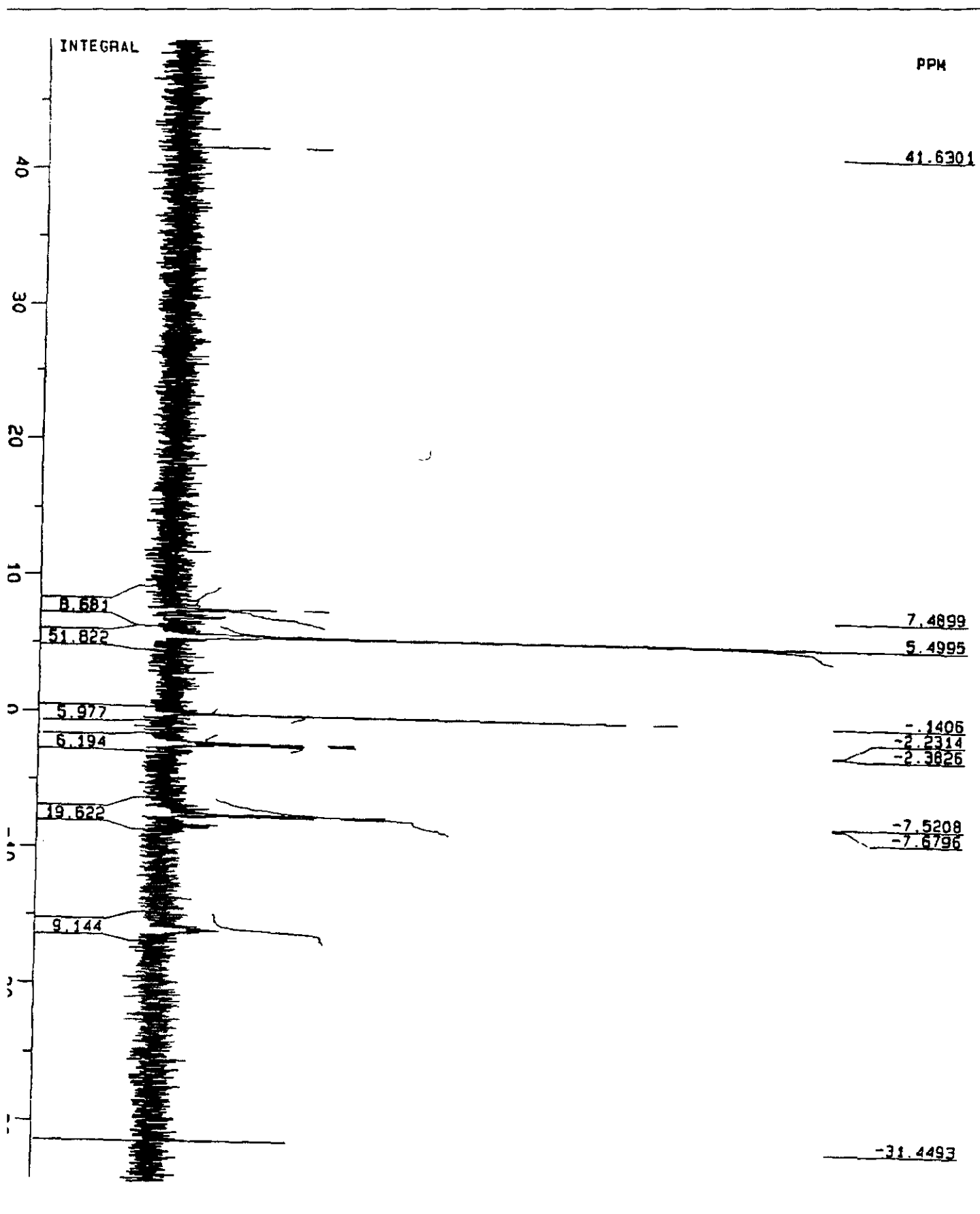


Fig.-151: Músculo Gastrocnemio Medial, Basal

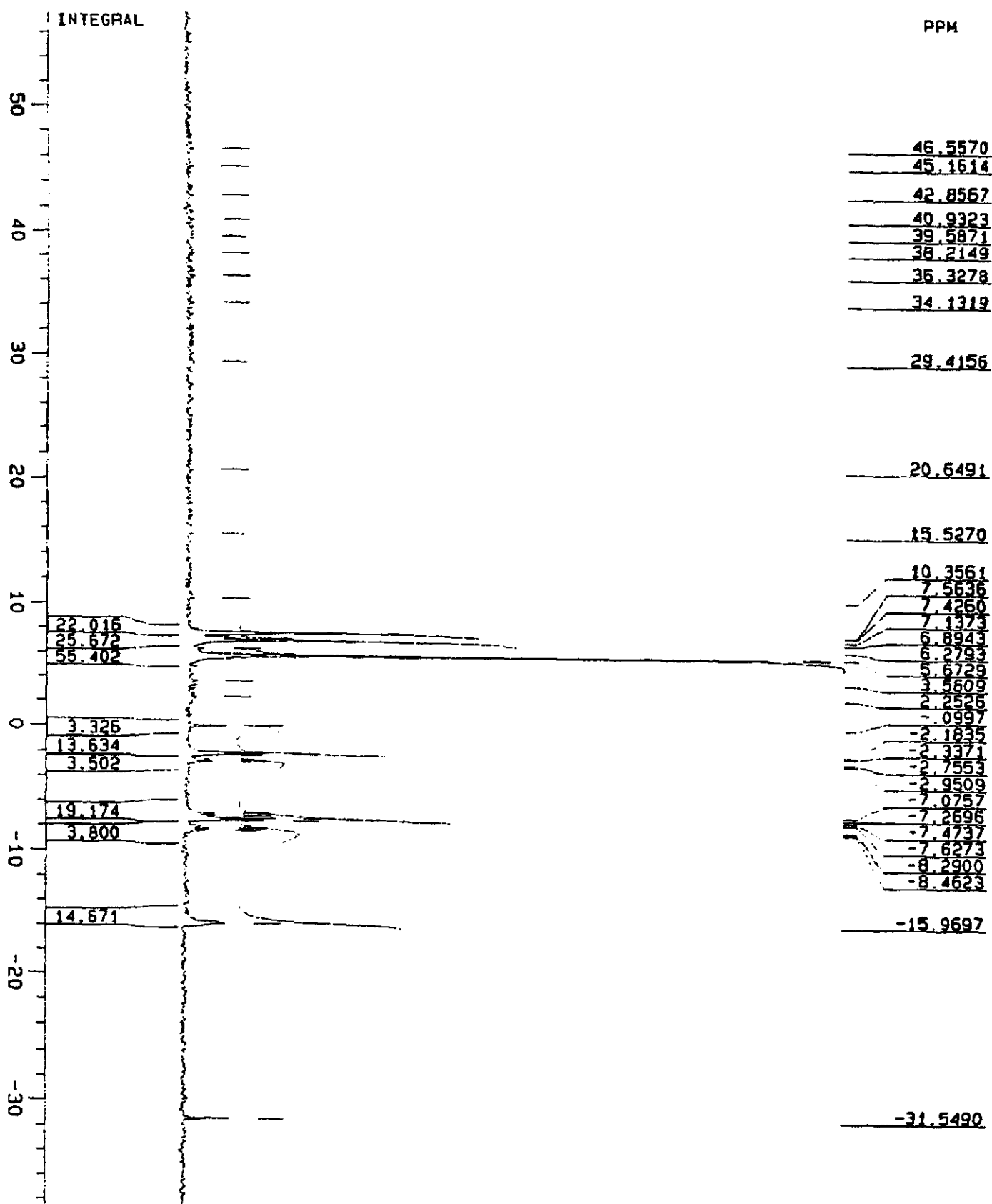


Fig.-152: Músculo Gastrocnemio Lateral, Basal

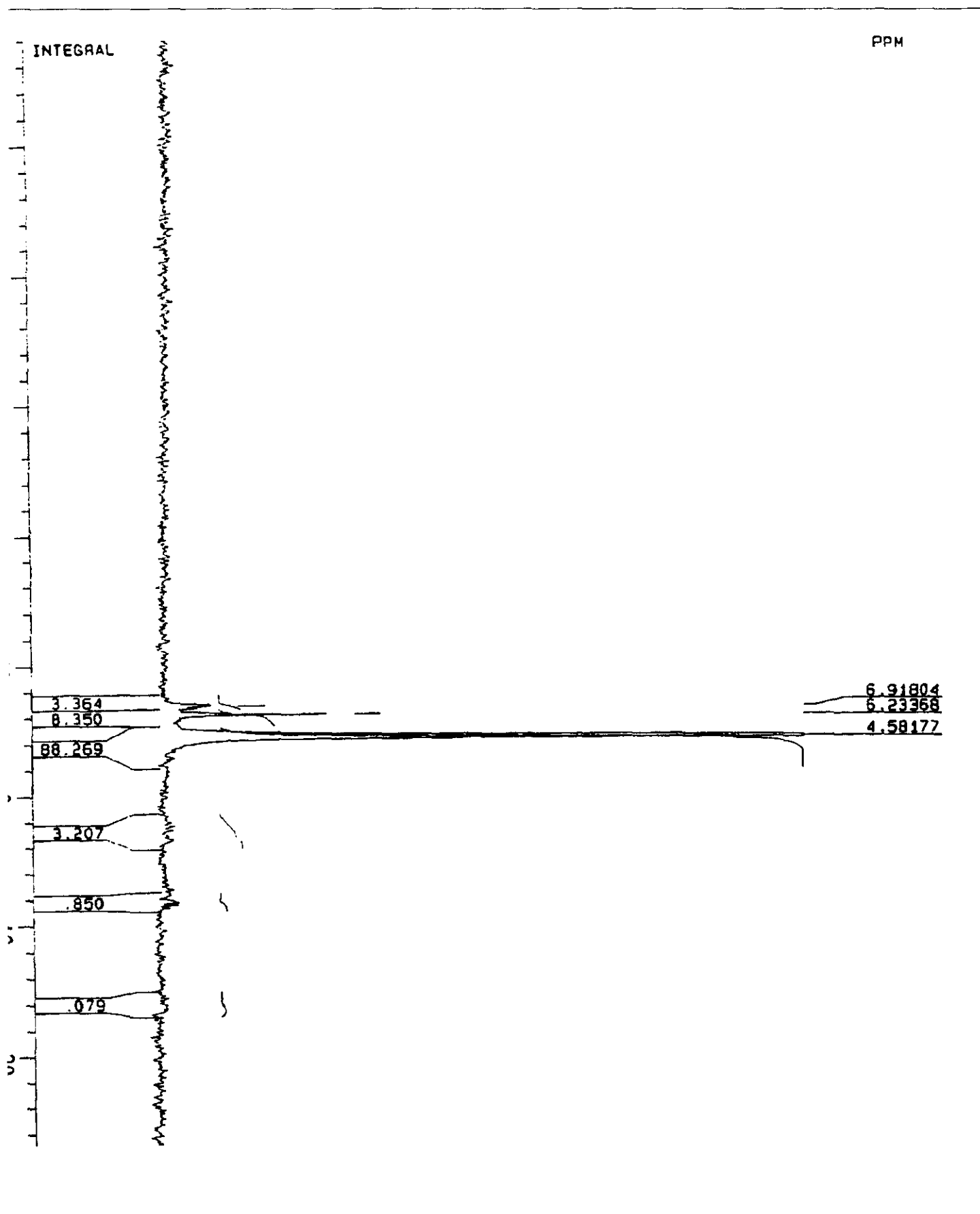


Fig.-153: 3h/20°C, Basal

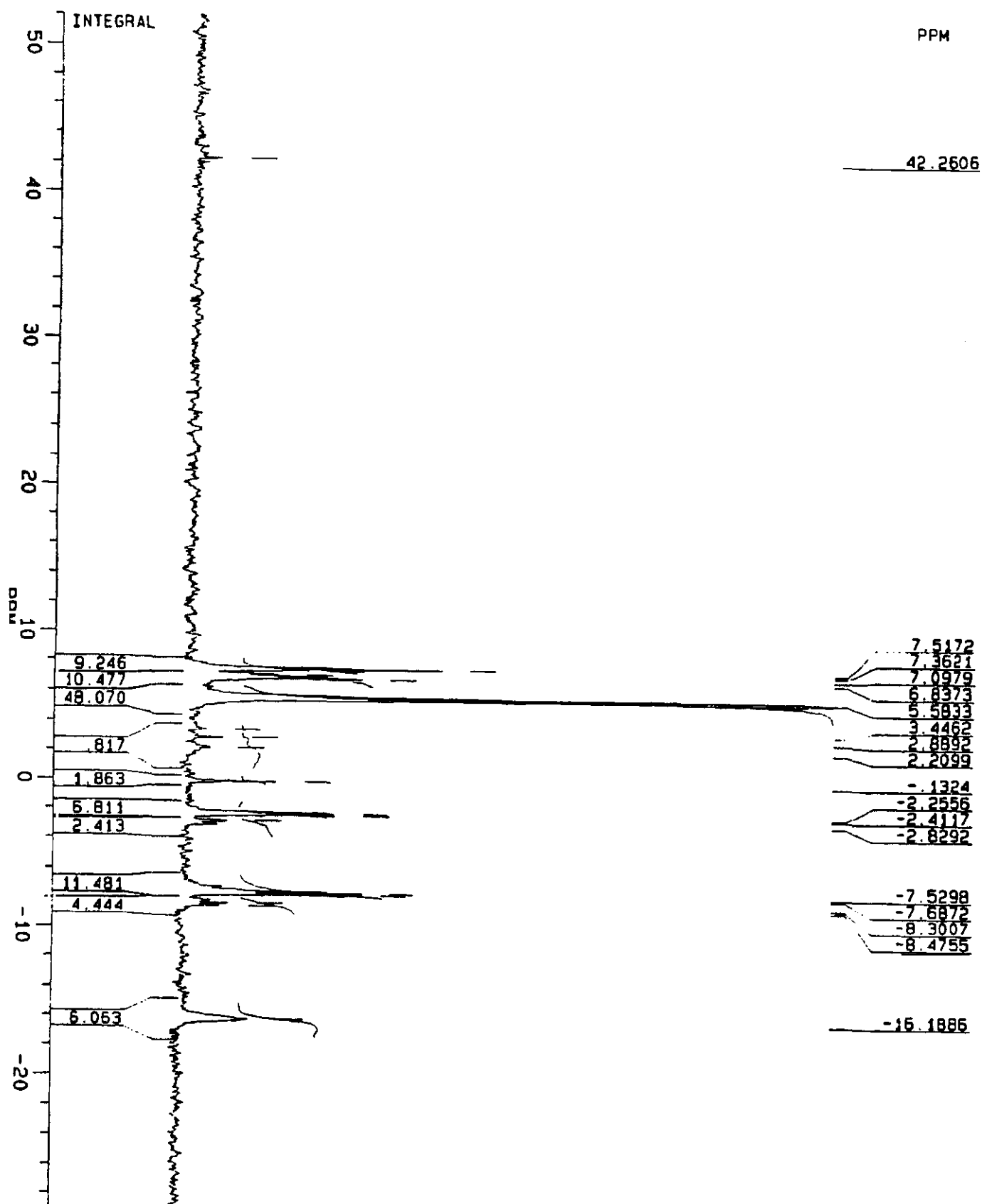


Fig.-154: 3h/20°C, 1 Semana

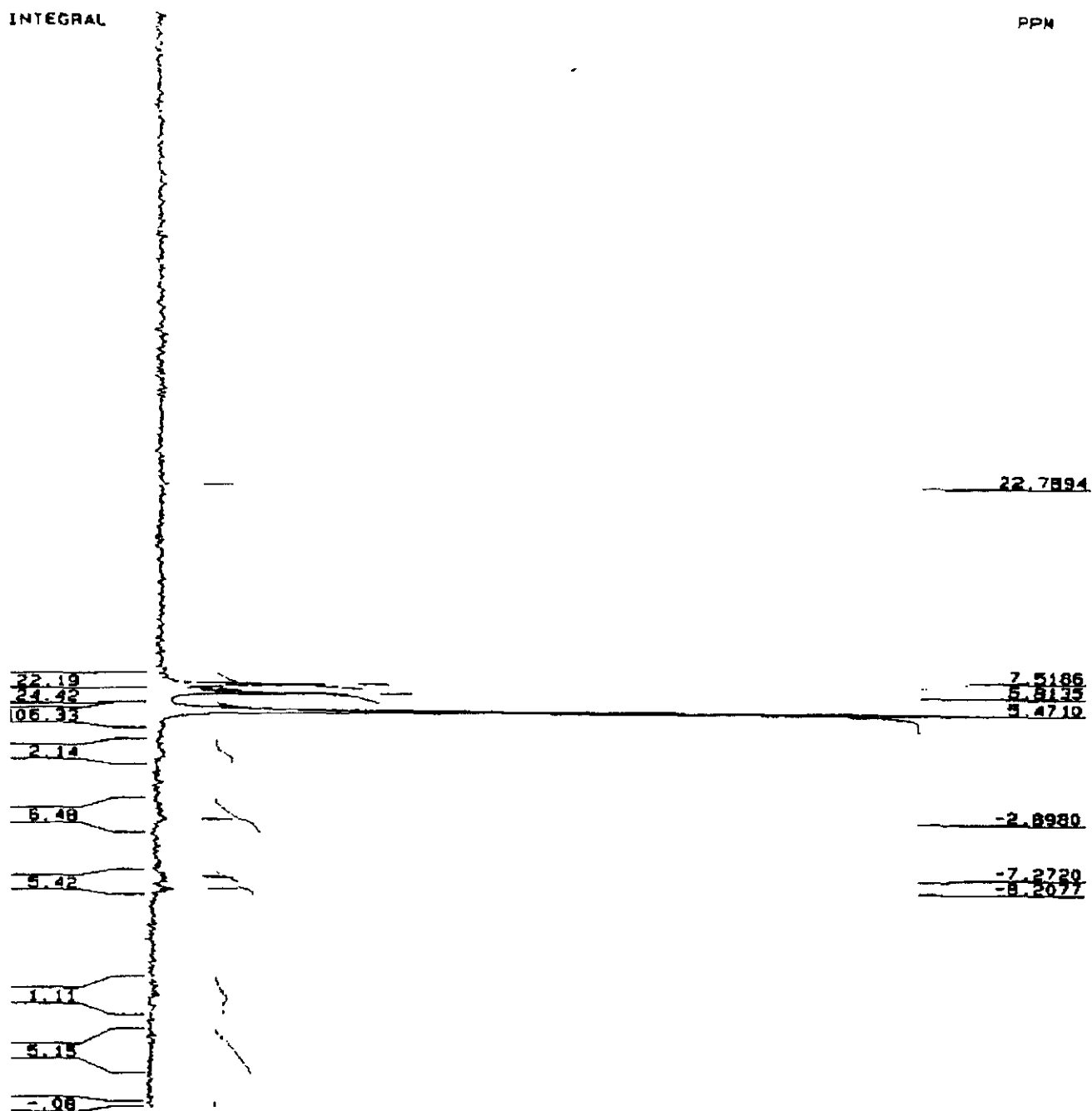


Fig.-155: 3h/10°C, Basal

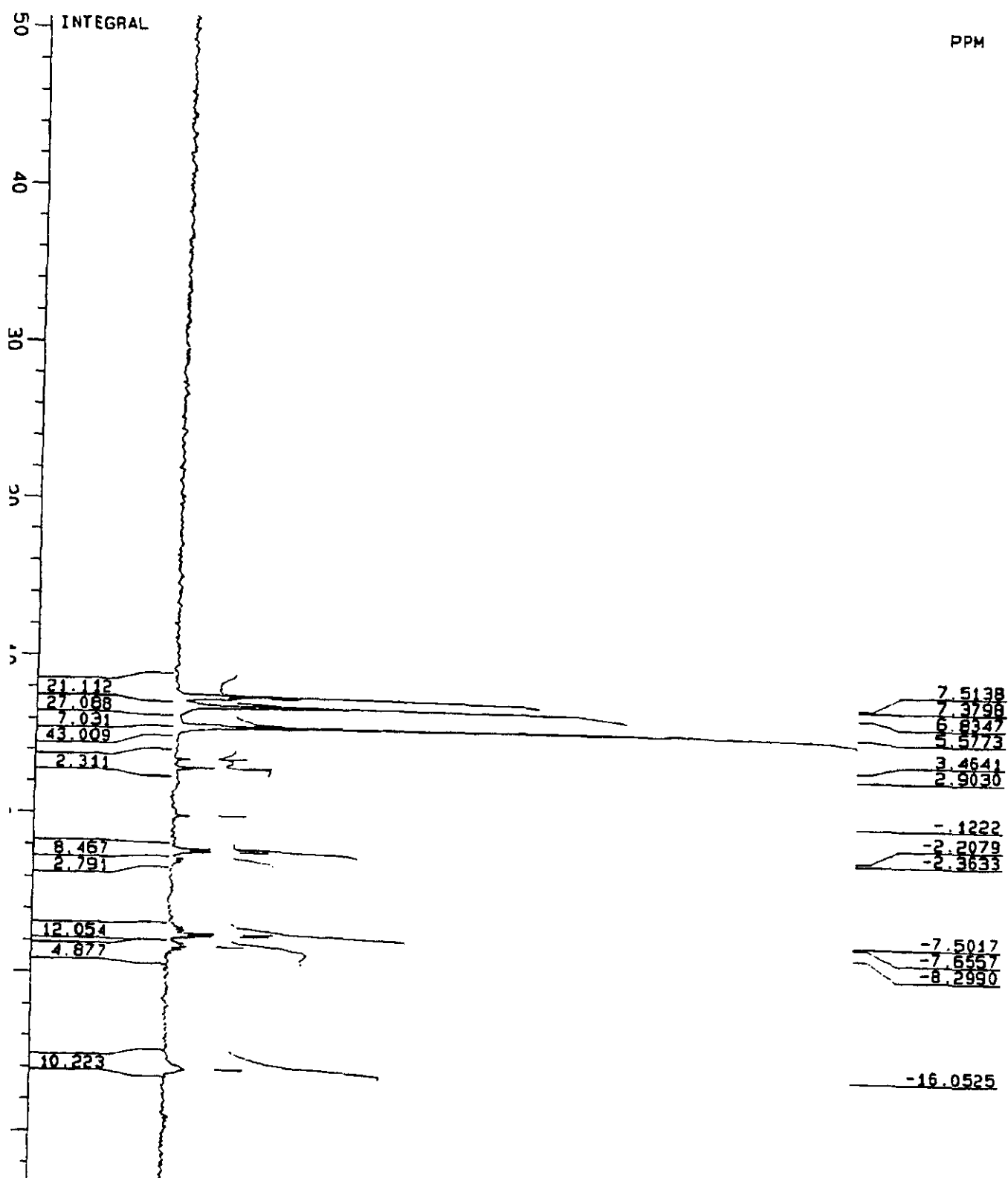


Fig.-156: 3h/10°C, 1 Semana

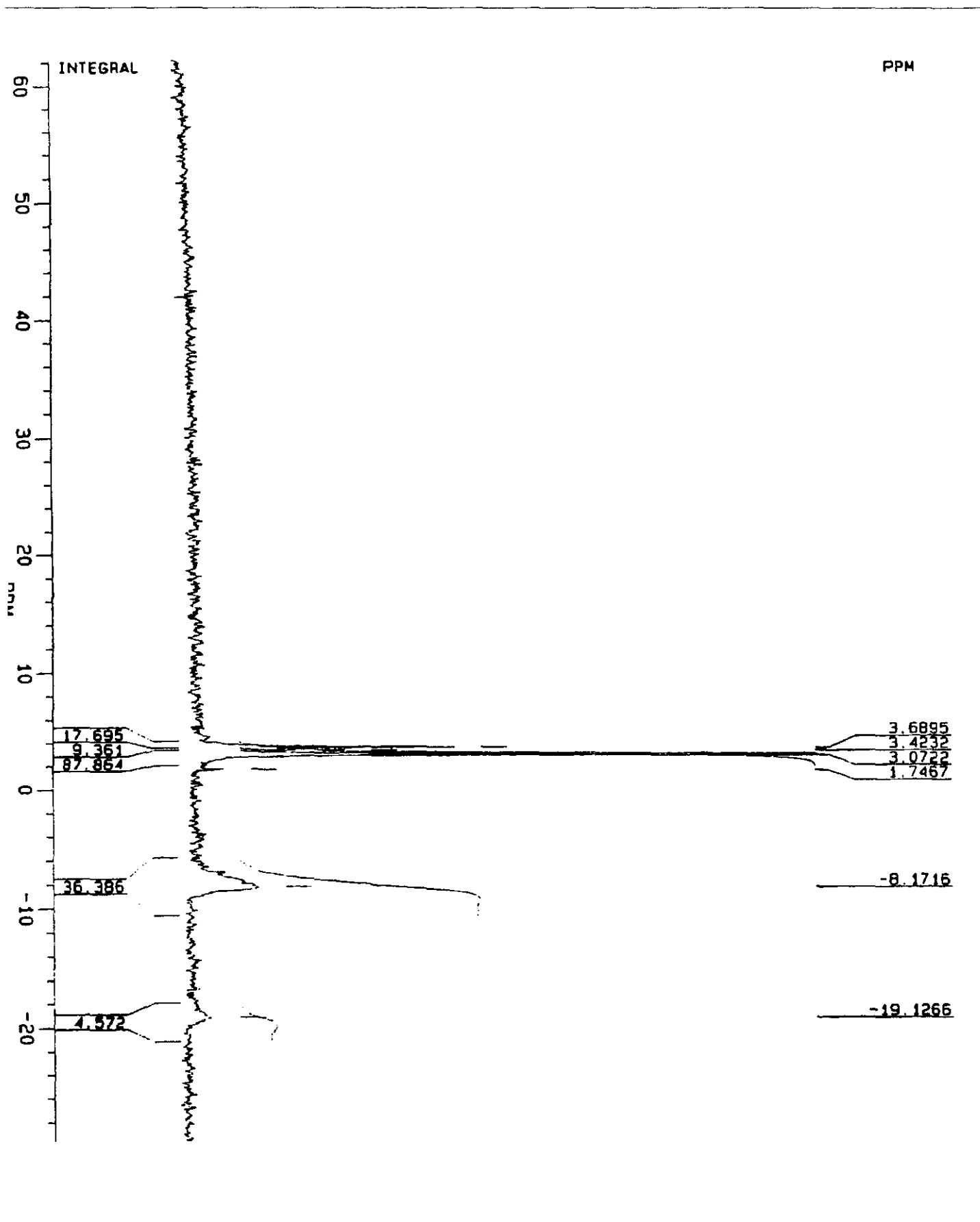


Fig.-157: 3h/4°C, Basal

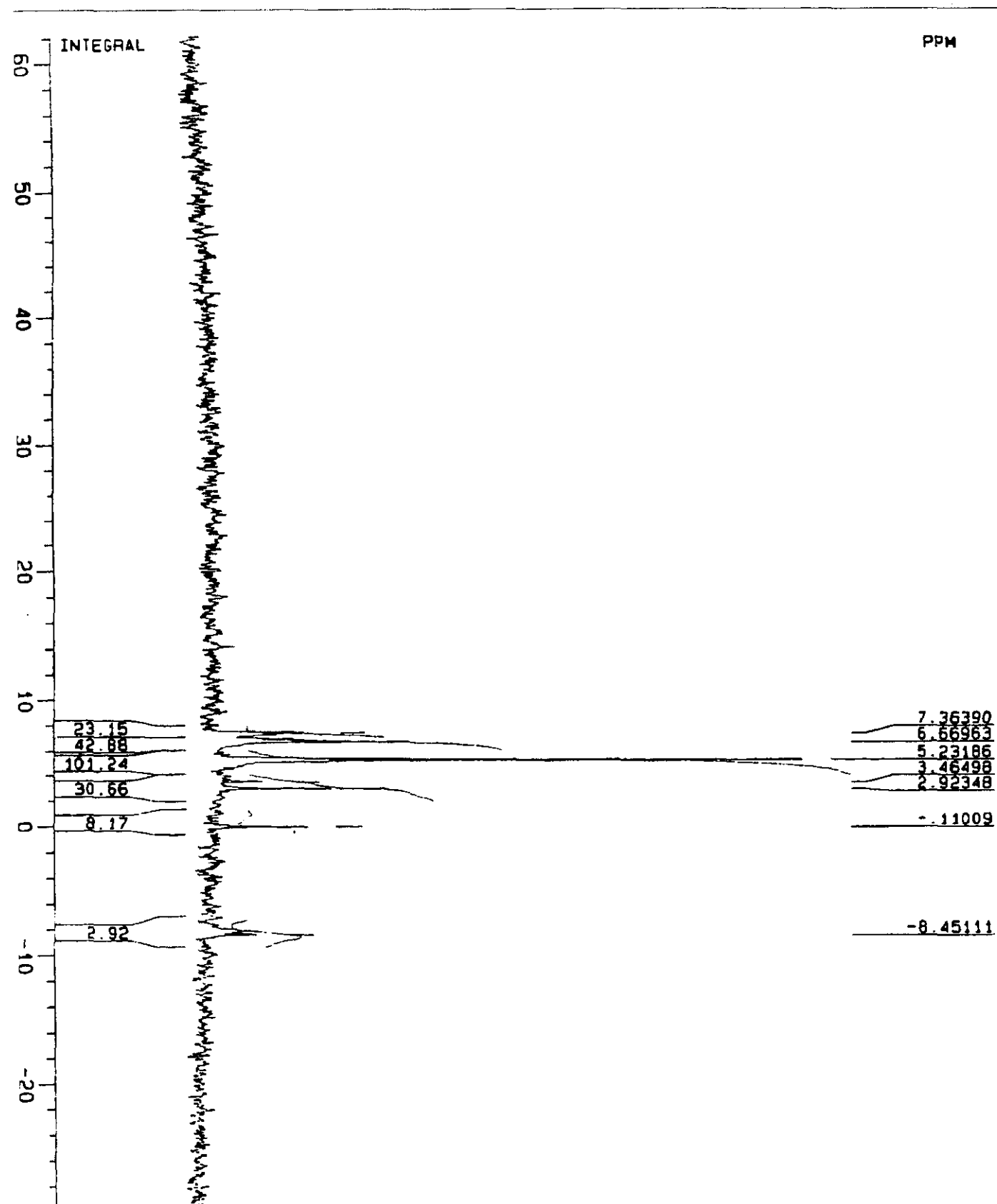


Fig.-158: 3h/4°C, 1 Semana

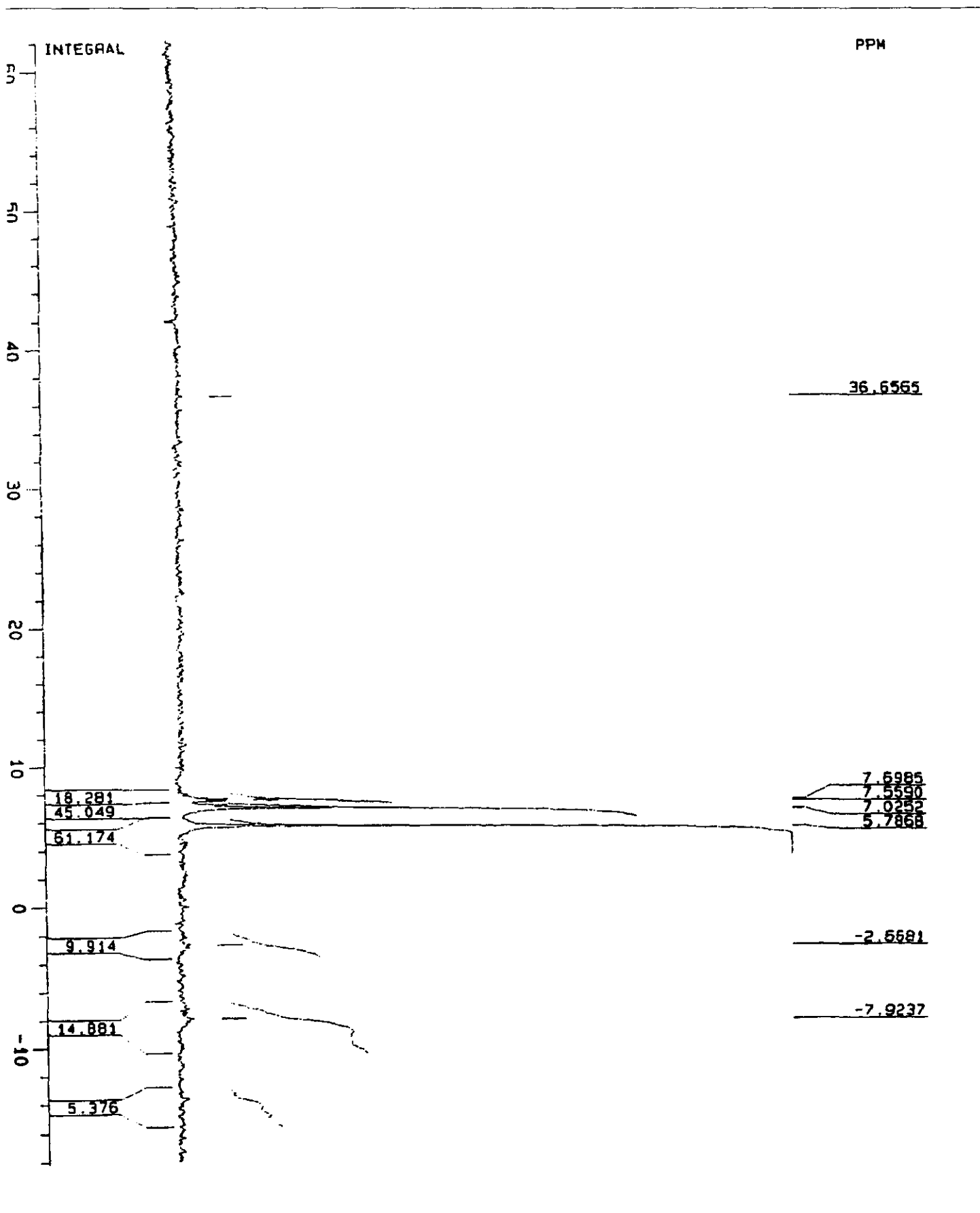


Fig.-159: 4h/20°C, Basal

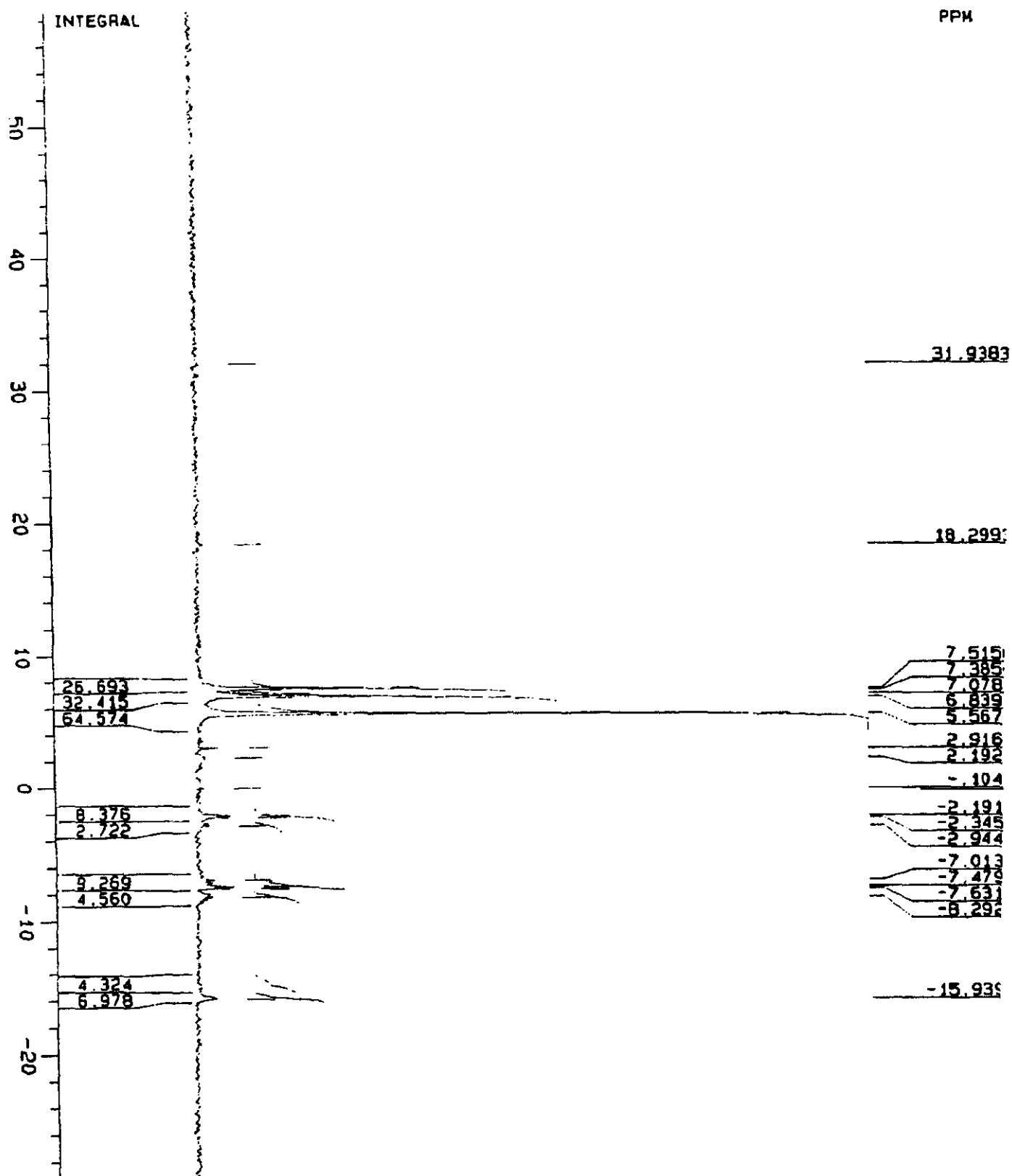


Fig.-160: 4h/20°C, 1 Semana

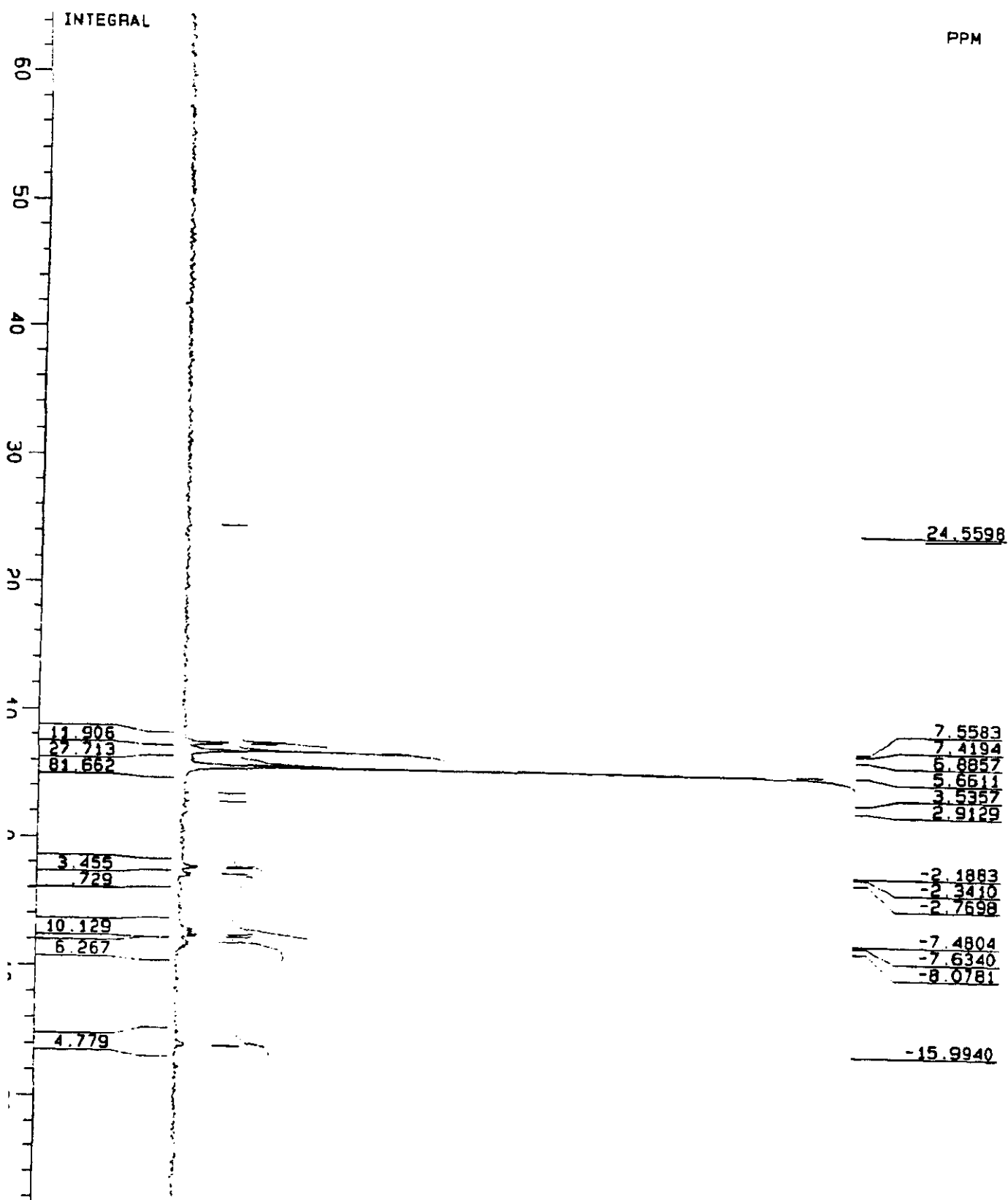


Fig.-161: 4h/10°C, Basal

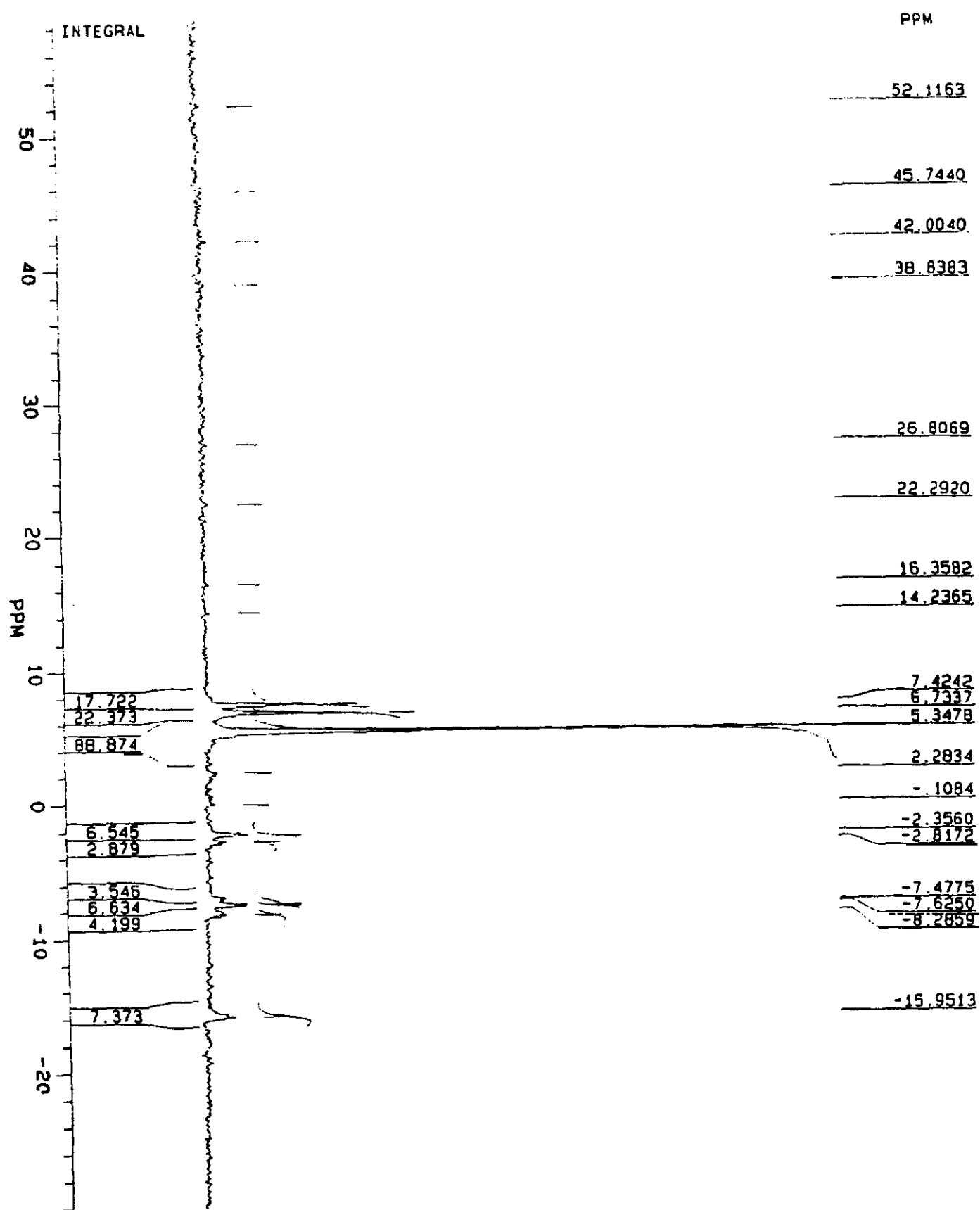


Fig.-162: 4h/10°C, 1 Semana

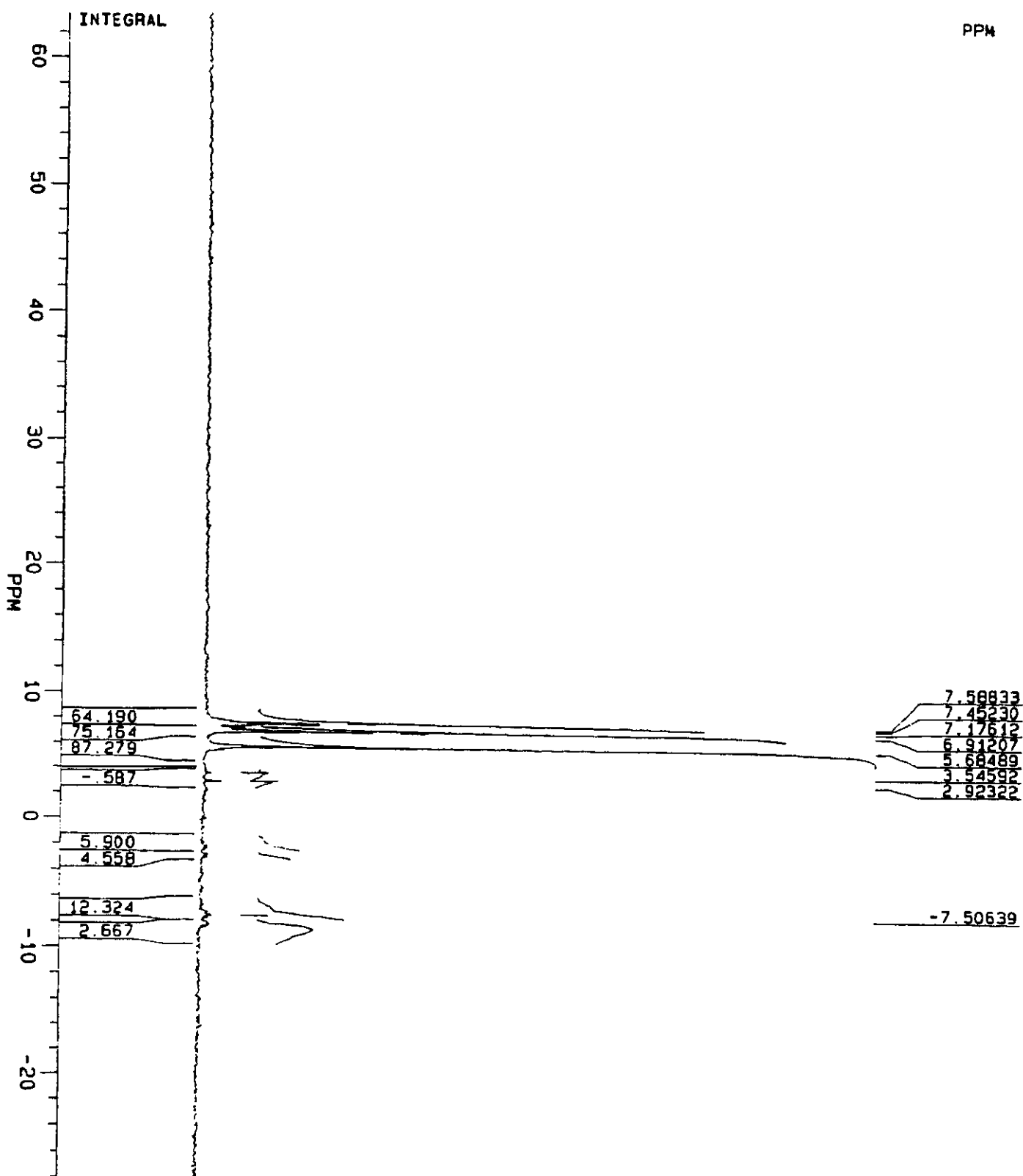


Fig.-163: 4h/4°C, Basal

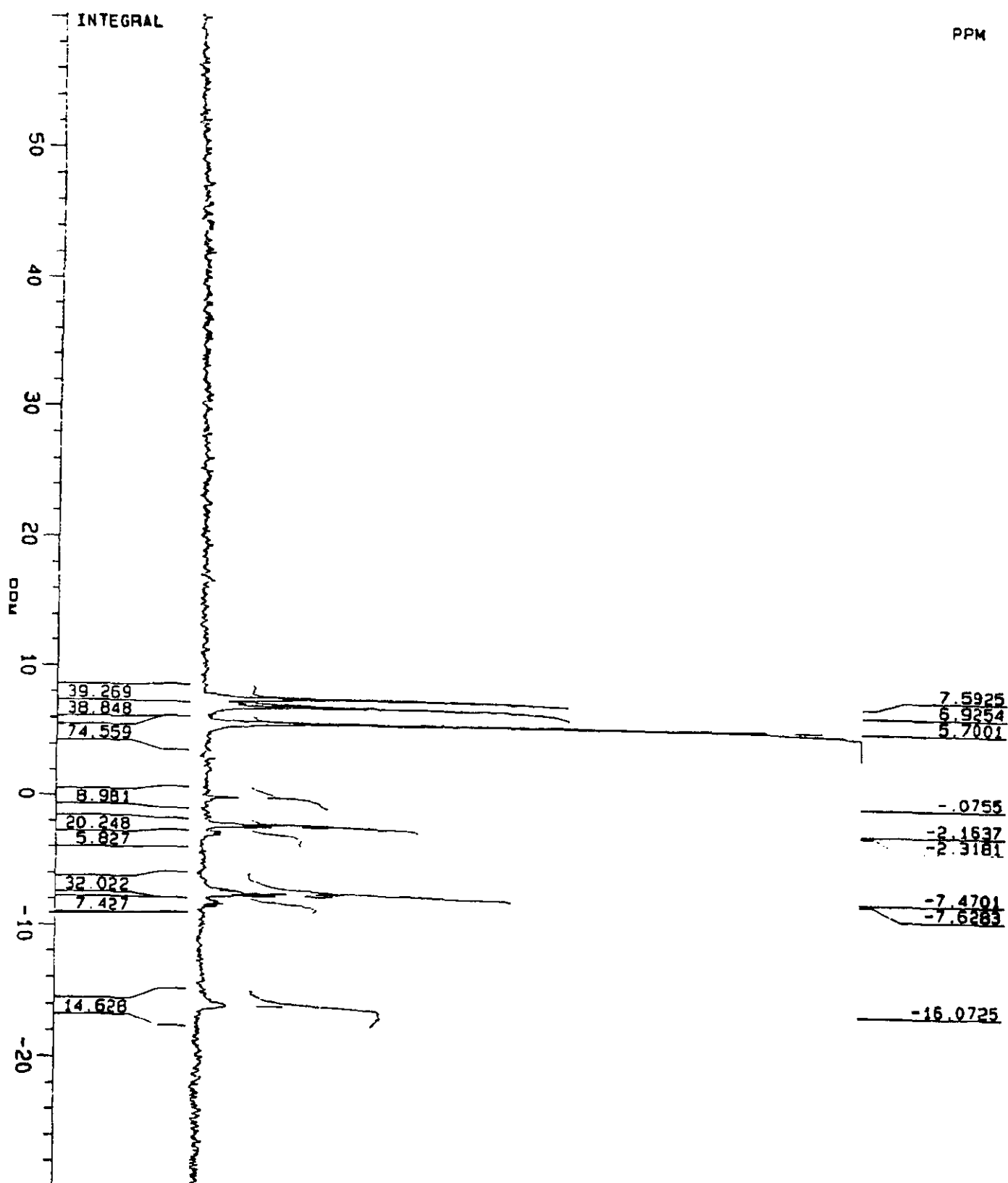


Fig.-164: 4h/4°C, 1 Semana

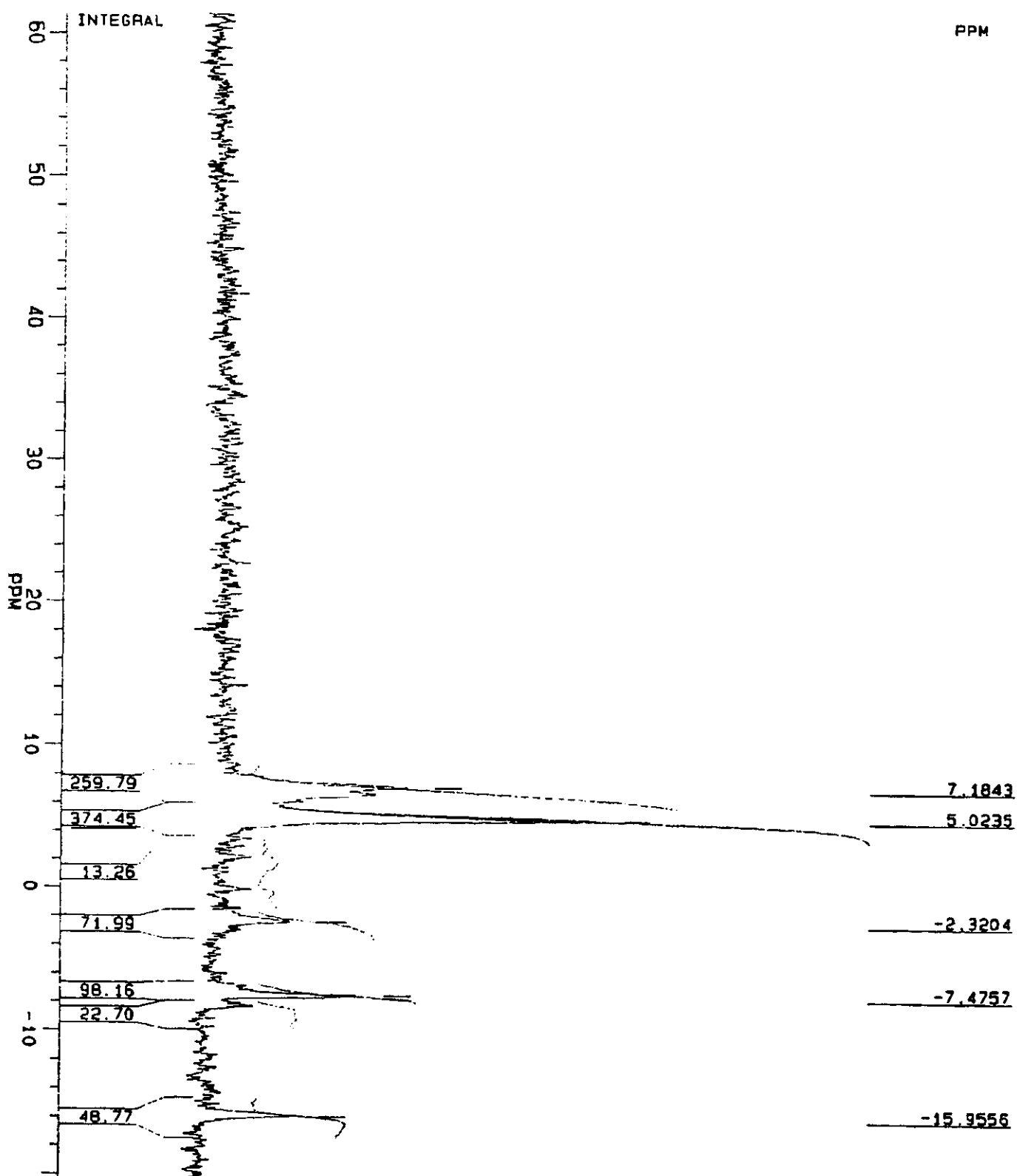


Fig.-165: 5h/20°C, Basal

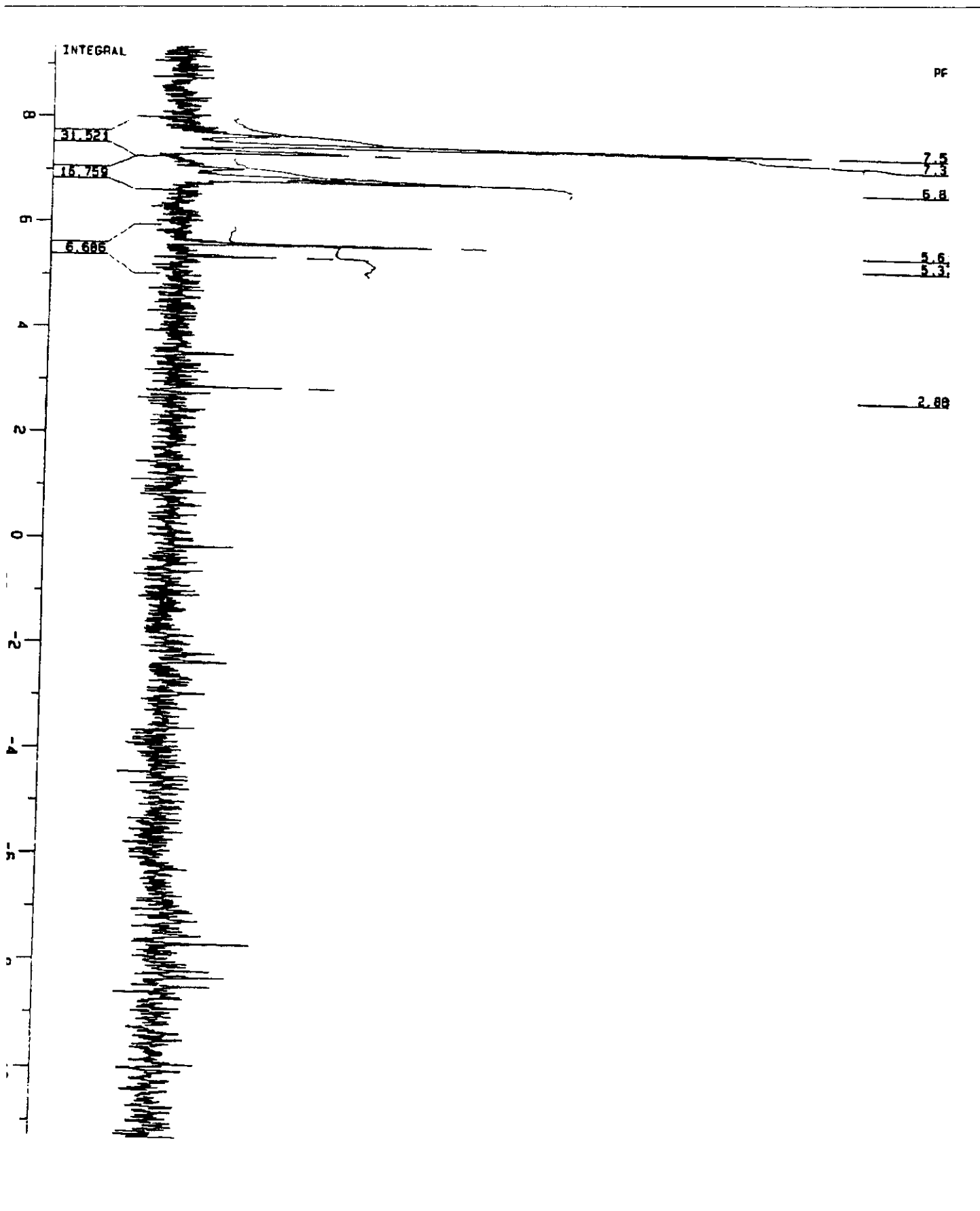


Fig.-166: 5h/20°C, 1 Semana

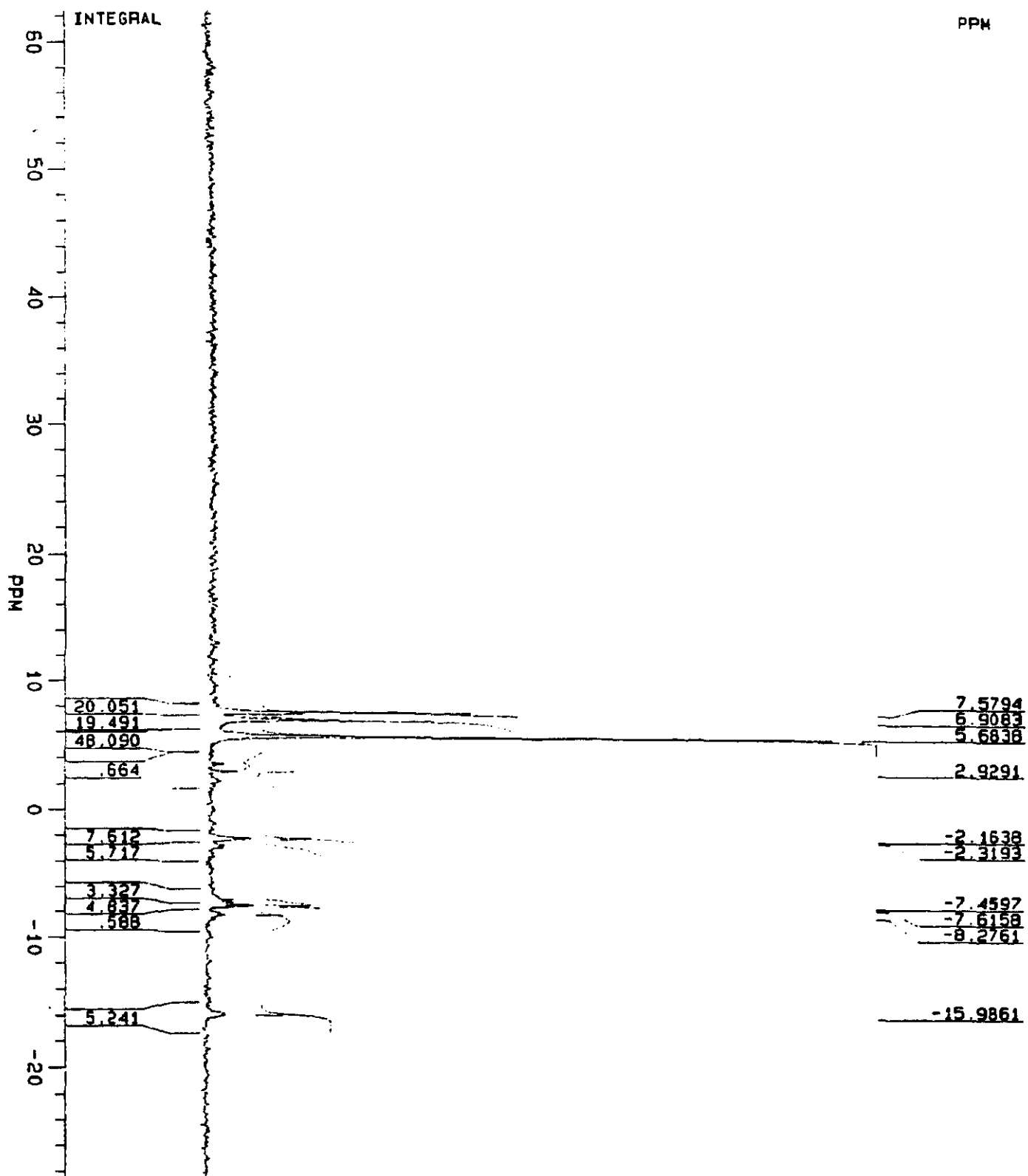


Fig.-167: 5h/10°C, Basal

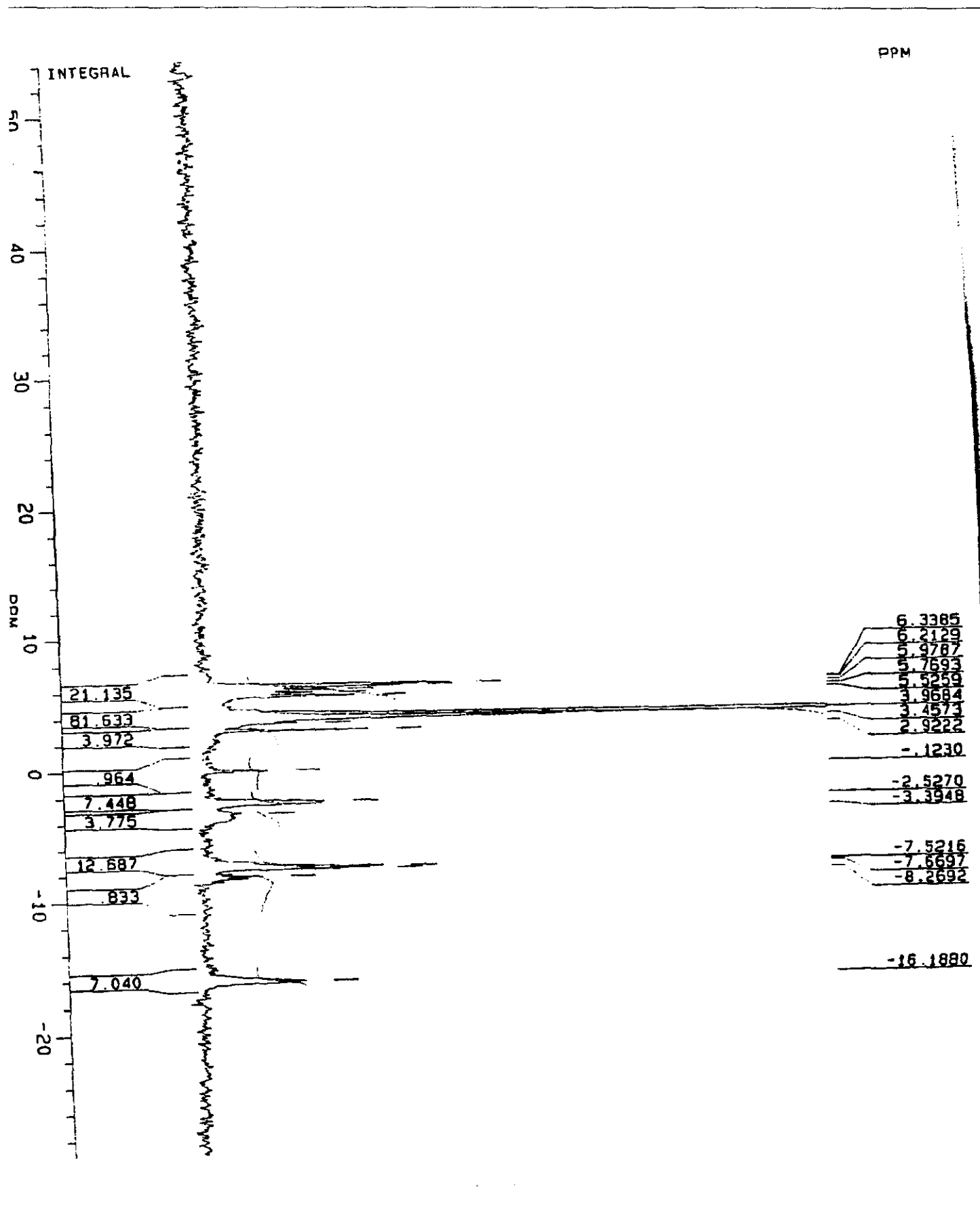


Fig.-168: 5h/10°C, 1 Semana

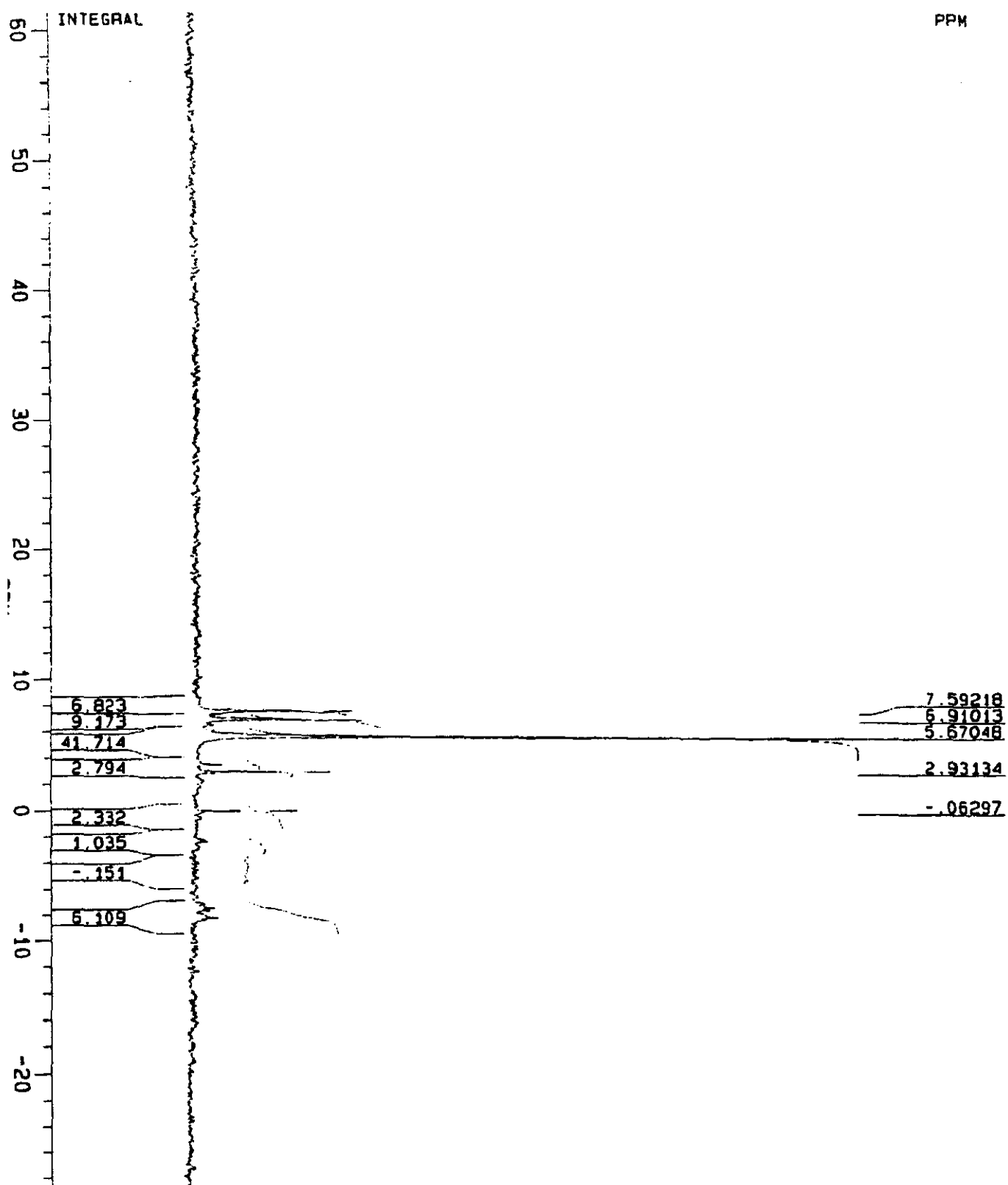


Fig.-169: 5h/4°C, Basal

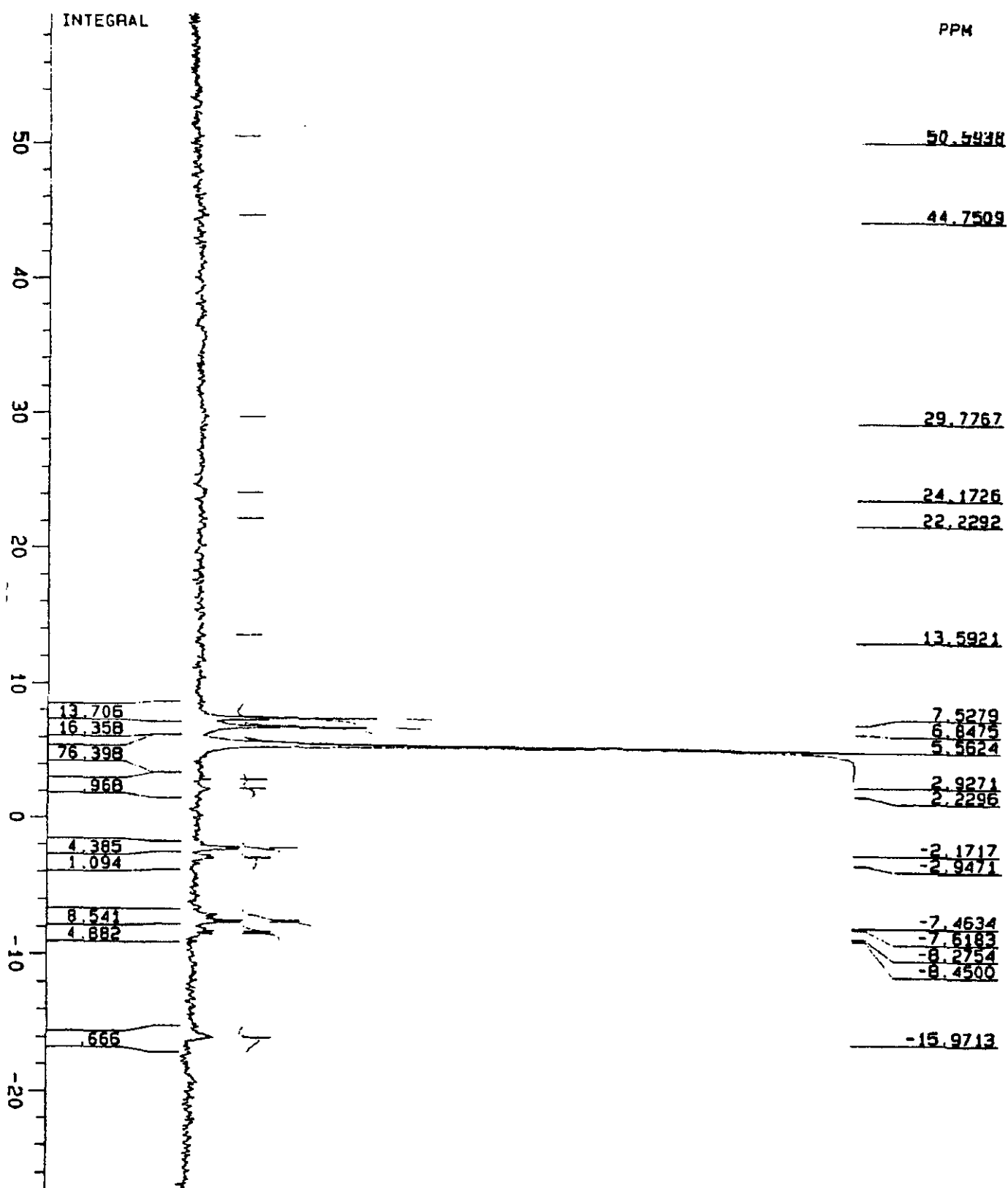


Fig.-170: 5h/4°C, 1 Semana

F.- Respuesta Neuromuscular

La respuesta neuromuscular se ha obtenido utilizando un Tof-Guard INMT y registrando la contracción del músculo tibial anterior y/o el músculo extensor largo de los dedos. Al perfundir con suero a 20°C se pierde capacidad contráctil del músculo cuanto mayor sea el tiempo de isquemia, **Tabla XXXIV**. Con la utilización de suero a 10°C se observa una disminución del poder contráctil muscular, pero con una mayor respuesta que la utilización de sueros a 4°C y 20°C, **Tabla XXXV**. Con suero a 4°C el comportamiento es parecido a la perfusión con suero a 20°C, disminuyendo la contractilidad según sea mayor el tiempo de isquemia, **Tabla XXXVI**.

Con 10 mA se obtiene una estimulación basal media de un 48,7 %; con la perfusión a 4°C hay una respuesta media total del 25,55%, con suero a 10°C del 30,27% y con suero a 20°C del 25,41 +/- 1,41%, **Fig.187**.

Con tiempos de isquemia de 3 horas y perfusión a 20°C se aprecia un descenso desde el 50 +/- 5% hasta el 25 +/- 5% al final de la isquemia, permaneciendo igual al revascularizar, **Fig.171,182 y 183**. Con suero a 10°C hay un descenso desde el 51,66 +/- 2,88% hasta el 23,33 +/- 2,88% y ascenso a los 30 minutos de revascularizar hasta el 26,66 +/- 5,77%, **Fig.174,181 y 183**. El suero a 4°C produce una caída desde el 50 +/- 8,66% hasta el 21,66 +/- 2,88%, con ascenso al revascularizar al 23,33 +/- 2,88%, **Fig.177,180 y 183**. A la semana, hay un ascenso con las tres perfusiones, hasta el 35 +/- 5% con suero a 20°C, **Fig.171,182 y 183**, hasta el 50% con suero a 10°C, **Fig.174,181 y 183**, y hasta el 33,33 +/- 11,54% con suero a 4°C, **Fig.177,180 y 183**. La isquemia de 4 horas produce mayores disminuciones de la respuesta muscular, con suero a 20°C hay un descenso desde el 48,33 +/- 5,77% hasta el 11,66 +/- 2,88% al final de la isquemia y ascenso ligero hasta el 13,33 +/- 2,88% al revascularizar, **Fig.172,182 y 184** con suero a 10°C se produce el mayor descenso, desde 55 +/- 5% hasta el 8,33 +/- 2,88% y ligera recuperación hasta el 11,66 +/- 2,88% al revascularizar, **Fig.175,181 y 184**; la perfusión con suero a 4°C produce una disminución desde el 46,66 +/- 5,77% hasta el 13,33 +/- 5,77% y aumento posterior hasta 18,33 +/- 7,63%, **Fig.178,180 y 184**. A la semana, con suero a 20°C se recupera hasta el 23,33 +/- 5,77%, **Fig.172,182 y 184**; con suero a 10°C se produce la mayor recuperación, hasta el 46,66 +/- 5,77%, **Fig.175,181 y 184**; la perfusión con suero a 4°C hasta el 26,66 +/- 5,77%, **Fig.178,180 y 184**. La

isquemia de 5 horas produce los mayores descensos en los valores obtenidos y las menores recuperaciones. Con suero a 20°C hay una disminución desde el 43,33 +/- 16,07% hasta el 5%, con aumento al 8,33 +/- 7,63% al revascularizar y al 16,66 +/- 7,63% a la semana, **Fig.173,182 y 185** con suero a 10°C hay un descenso desde el 46,66 +/- 7,63% hasta el 10 +/- 5%, con nueva disminución al revascularizar hasta el 6,66 +/- 2,88% y elevación hasta el 26,66 +/- 2,88% a la semana, **Fig.176,181 y 185**; la perfusión con suero a 4°C provoca un descenso desde el 46,66 +/- 5,77% hasta el 5%, con mínima recuperación hasta el 6,66 +/- 2,88% al revascularizar y aumento al 15% a la semana de la isquemia, **Fig.179,180 y 185**.

Las medias totales, tomadas por tiempos de isquemia y por temperaturas de perfusión, se describen en las **Fig.186 y 187**.

Al estudiar los tiempos de isquemia apreciamos que la mejor recuperación se produce con tiempos de 3 horas, menor con 4 horas y mucho menor recuperación con 5 horas de isquemia, **Fig.186**.

Si tenemos en cuenta las temperaturas de perfusión observamos que el suero a 10°C presenta la mejor recuperación, siendo la misma al perfundir con suero a 20°C y 4°C, **Fig.187**.

En el estudio estadístico existe una relación muy significativa ($p<0,0001$) entre el momento de la medida y el tiempo de isquemia y el momento y la temperatura de perfusión, muy significativa ($p<0,0001$) respecto al tiempo de isquemia y significativa ($p<0,04$) en relación a la temperatura, **Tabla XXXVII y XXXVIII**. Con los contrastes multivariados hay mayor relación significativa ($p<0,0001$) entre el momento y la temperatura que entre el momento y el tiempo ($p<0,005$). Con el test de Kruskal-Wallis es significativa ($p<0,08$) la interacción entre el tiempo y la temperatura.

La estimulación con 20 mA presenta un valor basal medio de un 72,59 +/- 1,11%, con la perfusión a 4°C hay una respuesta media total del 46,52%, con suero a 10°C del 49,58% y con suero a 20°C del 50,41 +/- 2%, **Fig.195**.

Con tiempo de isquemia de 3 horas y perfusión a 20°C se produce un descenso desde el 73,33 +/- 2,88% hasta el 51,66 +/- 5,77%, con un nuevo descenso al revascularizar hasta el 48,33 +/- 2,88%, **Fig.171,190 y 191**. Con suero a 10°C hay un descenso desde el 71,66 +/- 2,88% hasta el 38,33 +/- 7,6%, aumentando al revascularizar hasta el 41,66 +/- 5,77%, **Fig.174,189 y 191**. El suero a 4°C origina un descenso desde el 56,66 +/- 5,77% hasta el 45 +/- 8,66%, elevándose al revascularizar hasta

el 51,66 +/- 10,4%, **Fig.177,188 y 191**. A la semana hay un ascenso de todos los valores, con suero a 20°C se produce la menor recuperación, al 50%, **Fig.171,190 y 191**; con suero a 10°C encontramos la mejor recuperación, el 70 +/- 5%, **Fig.174,189 y 191**, y con suero a 4°C recuperación superior al suero a 20°C, 53,33 +/- 17,55%, **Fig.177,188 y 191**. Al someter a una extremidad a 4 horas de isquemia y perfusión a 20°C hay un descenso desde el 73,33 +/- 2,88% hasta el 43,33 +/- 7,63%, con nuevo descenso al revascularizar hasta el 41,66 +/- 7,63%, **Fig.172,190 y 192**. Con suero a 10°C hay un descenso desde el 73,33 +/- 2,88% hasta el 28,33 +/- 2,88%, con aumento al revascularizar hasta el 33,33 +/- 2,88%, **Fig.175,189 y 192**. Al perfundir con suero a 4°C hay una caída desde el 71,66 +/- 7,63% hasta el 40 +/- 5%, con una recuperación al revascularizar hasta el 48,33 +/- 2,88%, **Fig.178,188 y 192**. A la semana, con suero a 20°C no hay variación en sus cifras con respecto a las obtenidas al revascularizar, 41,66 +/- 12,58%, **Fig.172,190 y 192**; con sueros a 10°C y 4°C se produce un ascenso de sus cifras, con suero a 10°C hasta el 68,33 +/- 2,88%, **Fig.175,189 y 192**, con suero a 4°C hasta el 53,33 +/- 2,88%, **Fig.178,188 y 192**. Al mantener la isquemia 5 horas y perfundir con suero a 20°C hay una disminución de sus valores desde el 78,33 +/- 5,77% hasta el 31,66 +/- 14,4%, elevándose al revascularizar hasta el 38,33 +/- 16,07%, **Fig.173,190 y 193**; con suero a 10°C hay un descenso desde el 78,33 +/- 2,88% hasta el 25 +/- 8,66%, con nuevo descenso al revascularizar hasta el 23,33 +/- 10,4%, **Fig.176,189 y 193**; el suero a 4°C produce una caída desde el 76,66 +/- 11,54% hasta el 13,33 +/- 2,88% y aumento al revascularizar hasta el 20 %, **Fig.179,188 y 193**. A la semana, se produce un descenso de sus valores al perfundir con suero a 20°C, hasta el 33,33 +/- 16,07%, **Fig.173,190 y 193**; con suero a 10°C encontramos la mayor recuperación, hasta el 43,33 +/- 2,88%, **Fig.176,189 y 193**, y con suero a 4°C existe una menor recuperación, hasta el 28,33 +/- 2,88%, **Fig.179,188 y 193**.

Las medias totales, tomadas por tiempos de isquemia y por temperaturas de perfusión, se exponen en las **Fig.194 y 195**.

Observando los tiempos de isquemia, la mejor recuperación al cabo de una semana se produce con isquemias de 3 horas, seguida por la isquemia de 4 horas y menor recuperación con 5 horas de isquemia, **Fig.194**.

Si consideramos las temperaturas de perfusión podemos comprobar como con suero a 10°C

obtenemos las mejores recuperaciones, seguido de la perfusión a 4°C y la peor recuperación es con suero a 20°C, **Fig.195**.

Mediante el análisis estadístico aparece una relación muy significativa ($p<0,0001$) respecto al tiempo de isquemia, la relación entre el momento de la toma y el tiempo de isquemia, y entre el momento de la toma y la temperatura del suero, siendo significativa ($p<0,01$) con respecto a la relación entre el momento de la toma, el tiempo de isquemia y la temperatura de perfusión, **Tabla XII y XL**. Mediante el método de los contrastes multivariados apreciamos un nivel muy significativo ($p<0,0001$) entre el momento y el tiempo o la temperatura, siendo significativo ($p<0,04$) relacionando el momento, el tiempo y la temperatura. El test de Kruskal-Wallis presenta un nivel muy significativo ($p<0,003$) relacionando el tiempo de isquemia y la temperatura de perfusión.

Al producir un estímulo con 30 mA obtenemos un valor basal medio de un 89,44 \pm 2,14%, con la perfusión a 4°C hay una respuesta media total del 59,72%, con suero a 10°C es del 63,19% y con suero a 20°C es del 58,47 \pm 2,81%, **Fig. 203**.

Al mantener en isquemia durante 3 horas a una extremidad y perfundirla con suero a 20°C, se produce un descenso de la respuesta muscular desde el 80 \pm 5% hasta el 61,66 \pm 2,88%, disminuyendo más al revascularizar, hasta el 55 \pm 5%, **Fig.171,198 y 199**; con suero a 10°C hay una caída desde el 95 \pm 8,66% hasta el 45 \pm 5%, ascendiendo al revascularizar hasta el 53,33 \pm 2,88%, **Fig.174,197 y 199**; el suero a 4°C induce un descenso desde el 76,66 \pm 25,16% hasta el 61,66 \pm 15,27%, ascendiendo al revascularizar hasta el 65 \pm 18,02%, **Fig.177,196 y 199**. A la semana de la isquemia encontramos un aumento en la respuesta neuromuscular con sueros a 10°C, hasta 83,33 \pm 5,77%, **Fig.174,197 y 199**, y a 20°C, hasta 60 \pm 14,24%, **Fig.171,198 y 199**, permaneciendo sin variaciones al perfundir con suero a 4°C, 60%, **Fig.177,196 y 199**. El periodo de isquemia de 4 horas y perfusión con suero a 20°C produce una disminución de sus valores desde el 91,66 \pm 2,88% hasta el 48,33 \pm 5,77%, con elevación al revascularizar hasta el 50 \pm 8,66%, **Fig.172,198 y 200**; el suero a 10°C disminuye desde el 96,66 \pm 5,77% hasta el 38,33 \pm 2,88%, ascendiendo al revascularizar hasta el 43,33 \pm 2,88%, **Fig.175,197 y 200**; la perfusión con suero a 4°C produce una disminución de la respuesta neuromuscular desde el 93,33 \pm 15,27% hasta el 56,66 \pm 5,77%, aumentando al revascularizar hasta el 60 \pm 10%, **Fig.178,196 y 200**. A la semana, la perfusión con suero a 10°C

aumenta de manera espectacular hasta el $80 \pm 5\%$, **Fig.175,197 y 200**; menor elevación al perfundir con suero a 4°C , hasta el $65 \pm 8,66\%$, **Fig.178,196 y 200**, y la perfusión con suero a 20°C permanece sin variación en sus cifras con respecto a las de revascularizar, de $50 \pm 13,22\%$, **Fig.172,198 y 200**. Con periodos de isquemia de 5 horas y perfusión con suero a 20°C apreciamos un descenso desde el $85 \pm 8,66\%$ hasta el $38,33 \pm 16,07\%$, aumentando al revascularizar hasta el $40 \pm 17,32\%$, **Fig.173,198 y 201**; el suero a 10°C produce una caída desde el $91,66 \pm 2,88\%$ hasta el $35 \pm 13,22\%$, no variando su valor al revascularizar, **Fig.176,197 y 201**; con suero a 4°C hay un descenso desde el $95 \pm 5\%$ hasta el 15% , ascendiendo al 25% al revascularizar, **Fig.179,196 y 201**. A la semana ascienden todos los valores, correspondiendo el mayor ascenso a la perfusión con suero a 10°C , hasta el $61,66 \pm 7,63\%$, **Fig.176,197 y 201**; seguido de la perfusión con suero a 4°C , hasta el $38,33 \pm 2,88\%$, **Fig.179,196 y 201**, y la menor elevación ocurre con suero a 20°C , hasta el $41,66 \pm 7,63\%$, **Fig.173,198 y 201**.

Las medias totales, tomadas por tiempos de isquemia y por temperaturas de perfusión, se hallan en las **Fig.202 y 203**.

Como en casos anteriores, la mejor recuperación neuromuscular se produce en las isquemias de 3 horas, seguido de las 4 horas y la peor recuperación en isquemias de 5 horas, **Fig.202**.

Las temperaturas de perfusión se comportan mostrando una mejor recuperación en las extremidades perfundidas con suero a 10°C , menor recuperación con suero a 4°C y la mínima recuperación se consigue al utilizar suero a 20°C , **Fig.203**.

En el análisis estadístico de la varianza se muestra una relación muy significativa ($p<0,001$) con el tiempo, el momento de la muestra y el tiempo o la temperatura; y la relación entre el momento de la toma, el tiempo de isquemia y la temperatura de perfusión es muy significativa ($p<0,0001$), **Tabla XLI y XLII**. Los contrastes multivariados confirman dicha relación, siendo más significativo ($p<0,0001$) la relación momento y temperatura, que la relación momento y tiempo ($p<0,002$) y la relación momento de la toma, tiempo de isquemia y temperatura de perfusión ($p<0,005$). El test de Kruskal-Wallis muestra una relación muy significativa ($p<0,001$) entre el tiempo de isquemia y la temperatura de perfusión.

Al estimular con **40 mA** obtenemos un valor medio basal de un $95,55 \pm 1,68\%$; con la perfusión con suero a 4°C se consigue una respuesta media total del $64,02\%$, con suero a 10°C del $68,88\%$ y con

suero a 20°C del 60 \pm 2,94%, **Fig.211**.

La isquemia de 3 horas con perfusión a 20°C origina un descenso de los valores desde 93,33 \pm 5,77% hasta el 68,33 \pm 5,77%, descendiendo aún más al revascularizar, hasta el 63,33 \pm 5,77%, **Fig.171,206 y 207**; con suero a 10°C hay una disminución desde el 95 \pm 13,22% hasta el 51,66 \pm 12,58%, ascendiendo al revascularizar hasta el 56,66 \pm 10,4%, **Fig.174,205 y 207**; el suero a 4°C produce un descenso desde el 90 \pm 17,32% hasta el 61,66 \pm 14,43%, con un leve ascenso al revascularizar, hasta el 63,33 \pm 16,07%, **Fig.177,204 y 207**. A la semana, todos los valores ascienden. Con suero a 20°C hasta el 71,66 \pm 2,88%, **Fig.171,206 y 207**; con suero a 10°C hasta el 90 \pm 18,02%, **Fig.174,205 y 207**, y con el suero a 4°C asciende hasta el 70 \pm 17,32%, **Fig.177,204 y 207**. En los periodos de isquemia de 4 horas perfundidos con suero a 20°C se origina un descenso desde el 86,66 \pm 5,77% hasta el 43,33 \pm 10,4%, aumentando al revascularizar hasta el 50 \pm 13,22%, **Fig.172,206 y 208**; con suero a 10°C hay una caída desde el 100% hasta el 48,33 \pm 2,88%, ascendiendo al revascularizar hasta el 51,66 \pm 2,88%, **Fig.175,205 y 208**; con perfusión a 4°C hay una disminución desde el 100% hasta el 58,33 \pm 2,88%, aumentando la respuesta al revascularizar, hasta el 61,66 \pm 2,88%, **Fig.178,204 y 208**. A la semana, ascienden todos los valores. El mayor aumento se produce perfundiendo con suero a 10°C, hasta el 91,66 \pm 2,88%, **Fig.175,205 y 208**; a continuación, la perfusión con suero a 4°C, hasta el 68,33 \pm 5,77%, **Fig.178,204 y 208**, y la menor elevación es con suero a 20°C, hasta el 51,66 \pm 17,55%, **Fig.172,206 y 208**. Manteniendo la extremidad en isquemia durante 5 horas se producen los mayores descensos en la capacidad de respuesta neuromuscular. Al perfundir con suero a 20°C se produce un descenso de los valores desde el 90 \pm 10% hasta el 30 \pm 5%, ascendiendo al revascularizar hasta el 33,33 \pm 7,6%, **Fig.173,206 y 209**. Si la perfusión es con suero a 10°C hay un descenso desde el 100 \pm 5% hasta el 35 \pm 8,66%, aumentando al revascularizar hasta el 41,66 \pm 15,27%, **Fig.176,205 y 209**. Con suero a 4°C disminuye desde el 105 \pm 5% hasta el 18,33 \pm 2,88%, elevándose al revascularizar la extremidad hasta el 26,66 \pm 2,88%, **Fig.179,204 y 209**. A la semana, ascienden todos los valores. La perfusión con suero a 10°C produce la mayor recuperación de la contractilidad, hasta el 65 \pm 5%, **Fig.176,205 y 209**, seguida de la perfusión con suero a 4°C, hasta el 45 \pm 5%, **Fig.179,204 y 209**. La menor recuperación ocurre con suero a 20°C, hasta el 38,33 \pm 7,63%, **Fig.173,206 y 209**.

Las medias totales, tomadas por tiempos de isquemia y por temperaturas de perfusión, se exponen en las **Fig.210 y 211**.

Con tiempos de isquemia de 3 horas la recuperación de la contractilidad es mejor que con 4 horas de isquemia y mucho mejor que con 5 horas de isquemia, **Fig.210**.

La perfusión con suero a 10°C muestra la mejor recuperación de la contractilidad muscular a la semana de la isquemia, con menor recuperación con suero a 4°C y mucho menor con suero a 20°C, **Fig.211**.

En el análisis de la varianza aparece una relación muy significativa ($p<0,0001$) con respecto al momento de la toma y al tiempo de isquemia, así como a la relación existente entre el momento de la medición y el tiempo o la temperatura, y la relación entre el momento, el tiempo y la temperatura, **Tabla XLIII y XLIV**. En el test de Kruskal-Wallis hay una relación significativa ($p<0,01$) entre el tiempo de isquemia y la temperatura de perfusión.

La estimulación con **50 mA** origina un valor medio basal de un 98,52 +/- 1,7%; con la perfusión con suero a 4°C se obtiene una respuesta media total del 67,08%, con suero a 10°C es del 68,88% y con suero a 20°C es del 65,28 +/- 2,91%, **Fig.219**.

Al mantener en isquemia 3 horas una extremidad y perfundirla con suero a 20°C obtenemos una respuesta neuromuscular que disminuye desde el 101,66 +/- 2,88% hasta el 71,66 +/- 2,88%, elevándose de forma leve al revascularizar hasta el 73,33 +/- 5,77%, **Fig.171,214 y 215**; con suero a 10°C se produce la mayor caída, desde el 95 +/- 13,22% hasta el 53,33 +/- 7,63%, elevándose al revascularizar hasta el 61,66 +/- 10,4%, **Fig.174,213 y 215**; el suero a 4°C manifiesta un descenso desde el 96,66 +/- 15,27% hasta el 63,33 +/- 16,07%, ascendiendo al revascularizar hasta el 68,33 +/- 16,07%, **Fig.177,212 y 215**. A la semana, la perfusión con suero a 10°C produce la mayor recuperación de la contractilidad, hasta el 93,33 +/- 15,27%, **Fig.174,213 y 215**; con suero a 4°C hay algo menos de recuperación, hasta el 75 +/- 13,22%, **Fig.177,212 y 215**, y la menor recuperación se produce al utilizar suero a 20°C, hasta el 76,67 +/- 2,88%, **Fig.171,214 y 215**. Si la isquemia provocada es de 4 horas, al perfundir con suero a 20°C observamos un descenso de la contractilidad desde el 95 +/- 8,66% hasta el 48,33 +/- 10,4%, aumentando al revascularizar hasta el 51,66 +/- 12,58%, **Fig.172,214 y 216**. Con el suero a 10°C hay un descenso desde el 98,33 +/- 2,88% hasta el 45% y ascenso al 50% al revascularizar, **Fig.175,213 y 216**. Al utilizar suero a 4°C hay una caída desde el 101,67 +/- 2,88% hasta el 56,66 +/-

5,77% y aumento al 68,33 \pm 2,88% al revascularizar, **Fig.178,212 y 216**. A la semana, ascienden con los tres métodos de perfusión; con suero a 10°C se produce la mayor recuperación de la contractilidad, hasta el 93,33 \pm 10,4%, **Fig.175,213 y 216**, seguido de la perfusión con suero a 4°C, hasta el 71,66 \pm 2,88%, **Fig.178,212 y 216**, y menor recuperación con el suero a 20°C, hasta el 58,33 \pm 17,55%, **Fig.172,214 y 216**. Con tiempos de isquemia de 5 horas se producen las mayores pérdidas de capacidad contráctil. Al perfundir con suero a 20°C hay un descenso desde el 93,33 \pm 11,54% hasta el 35 \pm 13,22%, con ascenso al 36,66 \pm 10,4% al revascularizar, **Fig.173,214 y 217**; utilizando suero a 10°C hay una importante caída desde el 101,66 \pm 7,63% hasta el 30 \pm 10% y ascenso al 41,66 \pm 15,27% al revascularizar, **Fig.176,213 y 217**; con suero a 4°C hay una disminución desde el 103,33 \pm 2,88% hasta el 21,66 \pm 2,88%, aumentando hasta el 28,33 \pm 2,88 % al revascularizar, **Fig.179,212 y 217**. A la semana, ascienden todos los valores. El suero a 10°C presenta la mejor recuperación, del 63,33 \pm 7,63%, **Fig.176,213 y 217**; seguido del suero a 4°C, que presenta un 50%, **Fig.179,212 y 217**, con menor recuperación al utilizar suero a 20°C, que es del 41,66 \pm 5,77%, **Fig.173,214 y 217**.

Las medias totales, tomadas por tiempos de isquemia y por temperaturas de perfusión, se representan en las **Fig.218 y 219**.

La recuperación de la contractilidad se produce de manera más fácil con isquemias de 3 horas, seguido de las 4 horas de isquemia y menor recuperación con 5 horas, **Fig.218**.

Al perfundir con suero a 10°C se obtienen mejores porcentajes de recuperación muscular a la semana del experimento, seguido de la perfusión con suero a 4°C y menor con suero a 20°C, **Fig.219**.

En el análisis estadístico apreciamos una relación muy significativa ($p < 0,0001$) con el tiempo, con la relación momento de la toma y tiempo de isquemia o temperatura de perfusión, y la relación momento, tiempo y temperatura, **Tabla XLV y XLVI**. En el test de Kruskal-Wallis hay una relación significativa ($p < 0,04$) entre la interacción tiempo de isquemia y temperatura de perfusión.

TABLA - XXXIV: RESPUESTA NEUROMUSCULAR (VALORES OBTENIDOS A UNA TEMPERATURA DE 20° C, +/- 1 ° C)

Tiempo			T° C	% RESPUESTA NEUROMUSCULAR				
				10 mA	20 mA	30 mA	40 mA	50 mA
3h	C5	Basal	33,7	55	75	80	90	100
		3h ISQ	26,2	30	55	60	65	70
		30' REV	27,8	30	45	50	60	70
		1 SEMANA	32,3	35	50	60	70	75
3h	C6	Basal	33,8	50	75	75	90	100
		3h ISQ	26,5	20	55	65	75	75
		30' REV	27,1	15	50	60	70	80
		1 SEMANA	34,7	30	50	60	70	75
3h	C16	Basal	32,8	45	70	85	100	105
		3h ISQ	26,1	25	45	60	65	70
		30' REV	27,7	30	50	55	60	70
		1 SEMANA	33,1	40	50	60	75	80
4h	C8	Basal	33,7	55	75	90	90	100
		4h ISQ	25,1	15	50	55	55	60
		30' REV	27,1	15	50	60	65	65
		1 SEMANA	35,5	30	55	65	70	75
4h	C10	Basal	31,6	45	75	95	80	85
		4h ISQ	23,8	10	45	45	35	40
		30' REV	26,5	10	40	45	40	40
		1 SEMANA	32,2	20	30	40	35	40
4h	C11	Basal	32,4	45	70	90	90	100
		4h ISQ	24,0	10	35	45	40	45
		30' REV	26,0	15	35	45	45	50
		1 SEMANA	32,3	20	40	45	50	60
5h	C9	Basal	34,7	55	75	80	100	100
		5h ISQ	24,0	5	40	50	35	45
		30' REV	26,8	15	50	50	40	40
		1 SEMANA	35,2	25	45	50	45	45
5h	C25	Basal	31,6	25	85	95	80	80
		5h ISQ	25,4	5	15	20	25	20
		30' REV	25,8	0	20	20	25	25
		1 SEMANA	33,3	10	15	35	30	35
5h	C29	Basal	33,7	50	75	80	90	100
		5h ISQ	26,7	5	40	45	30	40
		30' REV	27,1	10	45	50	35	45
		1 SEMANA	35,9	15	40	40	40	45

ISQ: Isquemia; REV: Revascularización.

Cn: Número de conejo utilizado.

T °C: Temperatura medida en piel.

RESPUESTA NEUROMUSCULAR A 20° C

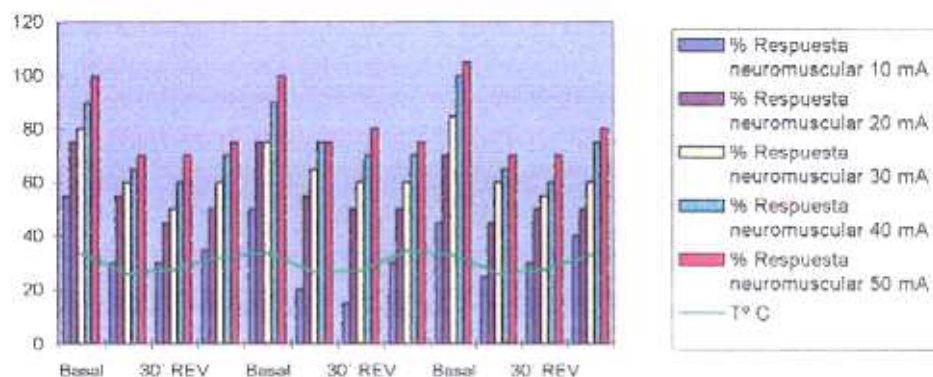


Fig.- 171. Tiempo: 3h

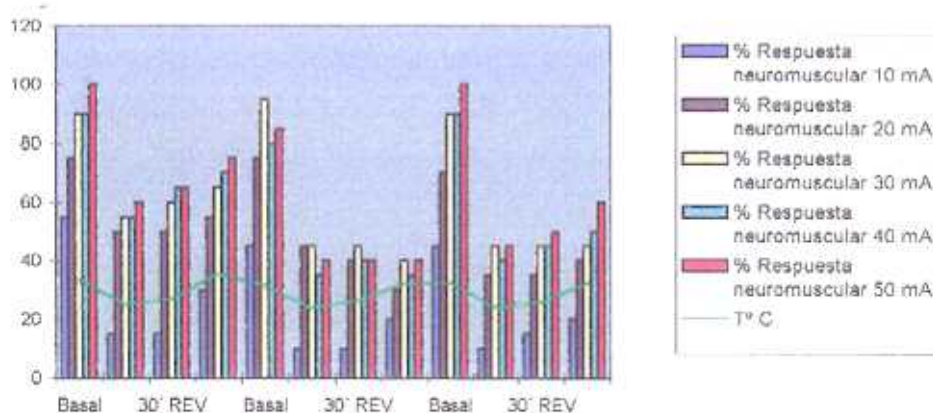


Fig.- 172. Tiempo: 4h

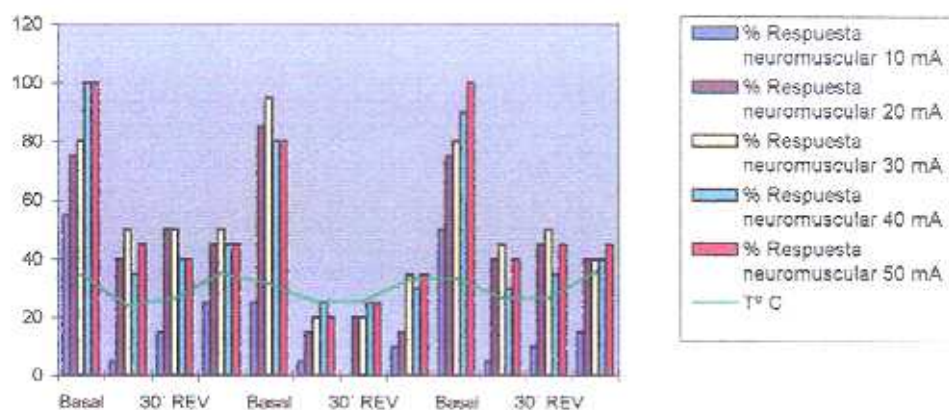


Fig.-173. Tiempo: 5h

TABLA - XXXV: RESPUESTA NEUROMUSCULAR (VALORES OBTENIDOS A UNA TEMPERATURA DE 10 °C, +/- 1 °C)

Tiempo			T° C	% RESPUESTA NEUROMUSCULAR				
				10 mA	20 mA	30 mA	40 mA	50 mA
3h	C12	Basal	32,4	55	70	100	100	105
		3h ISQ	22,2	25	30	40	50	55
		30' REV	23,0	30	35	55	60	65
		1 SEMANA	32,9	50	70	80	105	110
3h	C14	Basal	32,1	50	75	100	105	100
		3h ISQ	22,4	20	40	50	65	60
		30' REV	23,1	30	45	55	65	70
		1 SEMANA	34,7	50	75	90	95	90
3h	C20	Basal	30,6	50	70	85	80	80
		3h ISQ	21,1	25	45	45	40	45
		30' REV	21,6	20	45	50	45	50
		1 SEMANA	32,9	50	65	80	70	80
4h	C13	Basal	33,5	55	75	100	100	100
		4h ISQ	22,0	5	30	40	50	45
		30' REV	23,1	10	35	45	50	50
		1 SEMANA	34,2	50	70	80	95	105
4h	C15	Basal	32,8	50	70	90	100	100
		4h ISQ	22,0	10	25	35	45	45
		30' REV	22,9	15	30	40	50	50
		1 SEMANA	33,1	40	65	75	90	90
4h	C23	Basal	31,7	60	75	100	100	95
		4h ISQ	22,0	10	30	40	50	45
		30' REV	22,8	10	35	45	55	50
		1 SEMANA	35,7	50	70	85	90	85
5h	C26	Basal	30,4	45	80	95	95	95
		5h ISQ	22,1	10	15	20	25	20
		30' REV	23,0	5	15	25	25	25
		1 SEMANA	32,8	25	45	55	60	55
5h	C28	Basal	30,9	55	80	90	100	110
		5h ISQ	23,2	15	30	40	40	30
		30' REV	24,7	5	20	30	45	45
		1 SEMANA	33,3	25	40	60	65	65
5h	C30	Basal	32,3	40	75	90	105	100
		5h ISQ	22,3	5	30	45	40	40
		30' REV	25,8	10	35	50	55	55
		1 SEMANA	34,9	30	45	70	70	70

ISQ: Isquemia; REV: Revascularización.

Cn: Número de conejo utilizado.

RESPUESTA NEUROMUSCULAR A 10° C

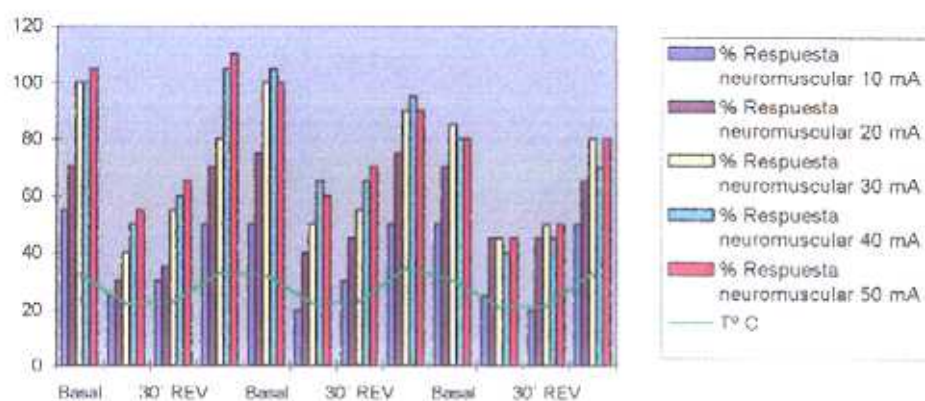


Fig.- 174. Tiempo: 3h

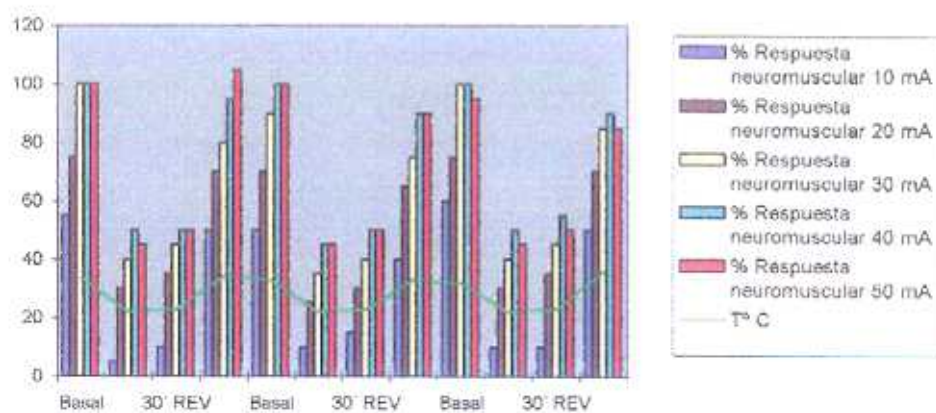


Fig.- 175. Tiempo: 4h

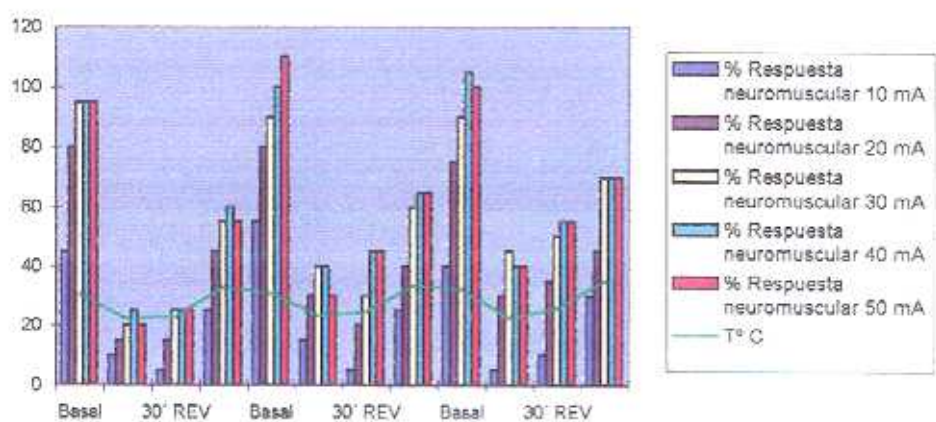


Fig.- 176. Tiempo: 5h

TABLA - XXXVI: RESPUESTA NEUROMUSCULAR (VALORES OBTENIDOS A UNA TEMPERATURA DE 4 °C, +/- 1 °C)

Tiempo			T° C	% RESPUESTA NEUROMUSCULAR				
				10 mA	20 mA	30 mA	40 mA	50 mA
3h	C17	Basal	31,8	60	60	100	100	110
		3h ISQ	22,4	25	50	75	70	75
		30' REV	23,5	25	60	80	70	80
		1 SEMANA	32,5	40	70	80	80	85
3h	C19	Basal	32,1	45	60	80	100	100
		3h ISQ	22,6	20	50	65	70	70
		30' REV	23,9	25	55	70	75	75
		1 SEMANA	32,9	40	55	70	80	80
3h	C21	Basal	30,8	45	50	50	70	80
		3h ISQ	21,9	20	35	45	45	45
		30' REV	22,5	20	40	45	45	50
		1 SEMANA	31,6	20	35	45	50	60
4h	C18	Basal	32,3	40	65	80	100	100
		4h ISQ	21,8	10	40	60	60	60
		30' REV	22,6	20	50	60	65	70
		1 SEMANA	33,1	30	55	60	75	75
4h	C22	Basal	32,0	50	70	90	100	105
		4h ISQ	22,0	10	35	50	55	60
		30' REV	23,3	10	45	50	60	65
		1 SEMANA	33,3	20	50	60	65	70
4h	C24	Basal	31,4	50	80	110	100	100
		4h ISQ	22,7	20	45	60	60	50
		30' REV	23,6	25	50	70	60	70
		1 SEMANA	32,7	30	55	75	65	70
5h	C27	Basal	31,8	50	90	95	100	100
		5h ISQ	21,2	5	15	15	15	20
		30' REV	22,3	5	20	25	25	30
		1 SEMANA	35,7	15	30	40	45	50
5h	C31	Basal	31,4	40	70	90	110	105
		5h ISQ	20,9	5	10	15	20	20
		30' REV	22,7	5	20	25	25	25
		1 SEMANA	33,7	15	25	35	40	50
5h	C32	Basal	32,1	50	70	100	105	105
		5h ISQ	21,8	5	15	15	20	25
		30' REV	23,3	10	20	25	30	30
		1 SEMANA	34,8	15	30	40	50	50

ISQ: Isquemia; REV: Revascularización.

Cn: Número de conejo utilizado.

RESPUESTA NEUROMUSCULAR A 4°C

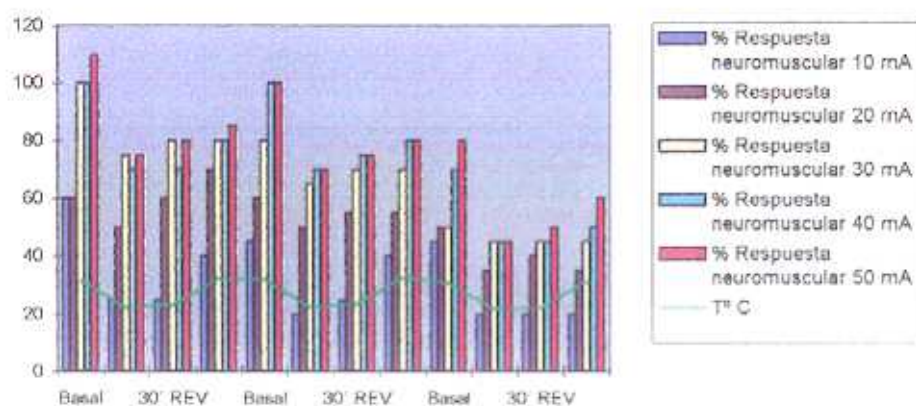


Fig.- 177. Tiempo: 3h

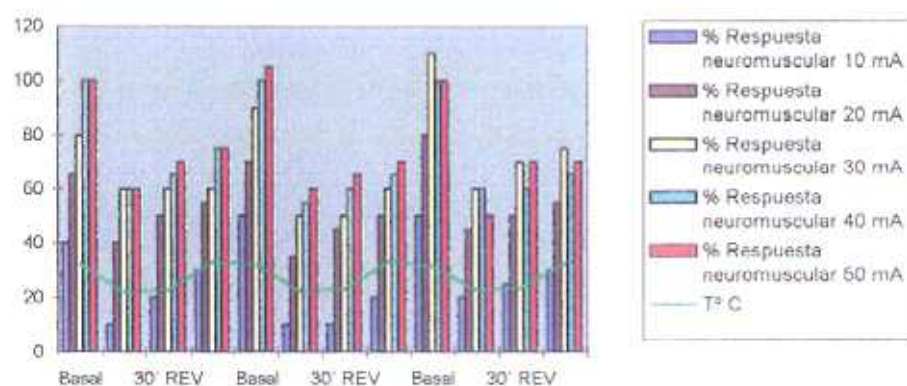


Fig.- 178. Tiempo: 4h

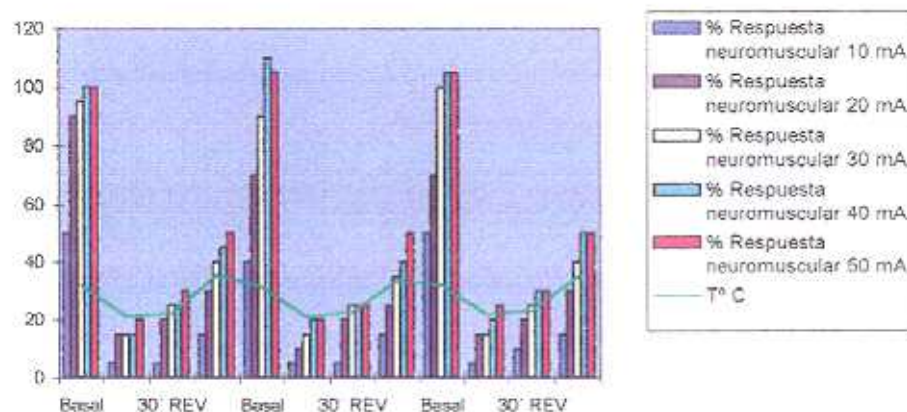


Fig.- 179. Tiempo: 5h

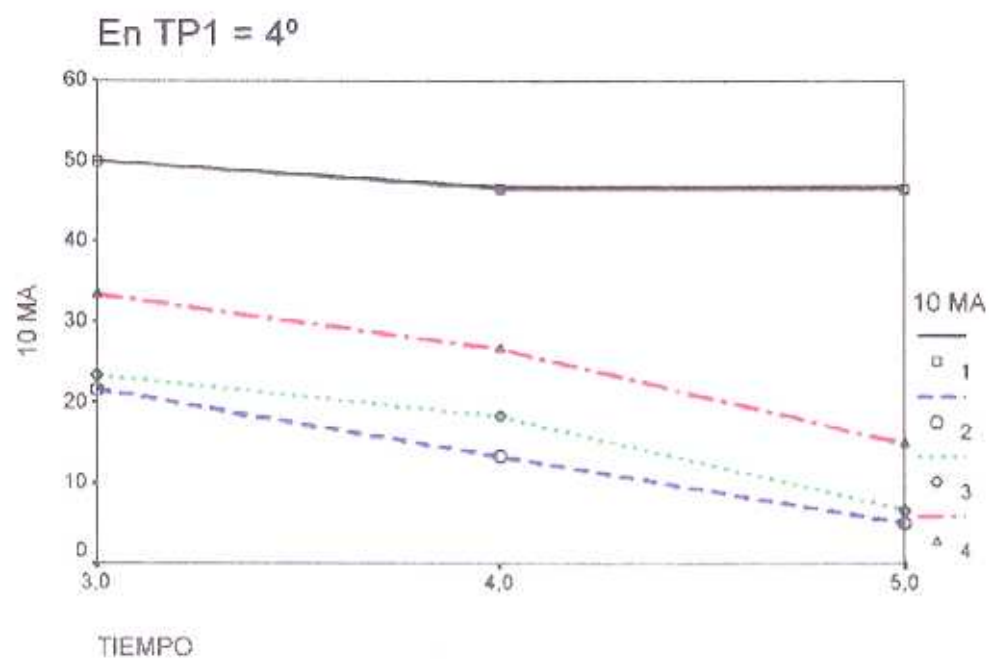


Fig.- 180. Suero a 4°C

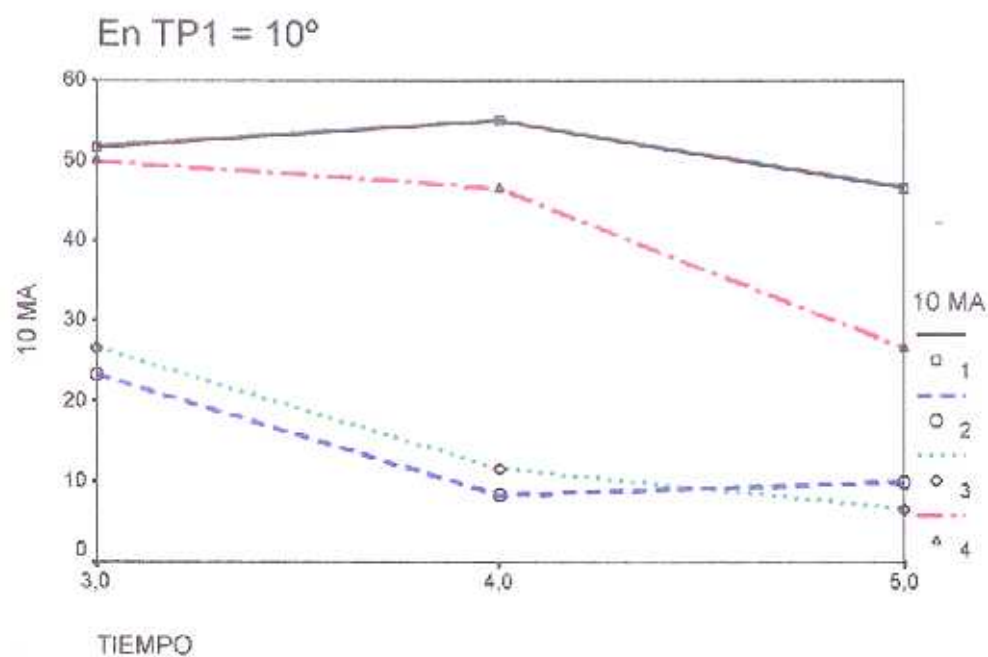


Fig.- 181. Suero a 10°C

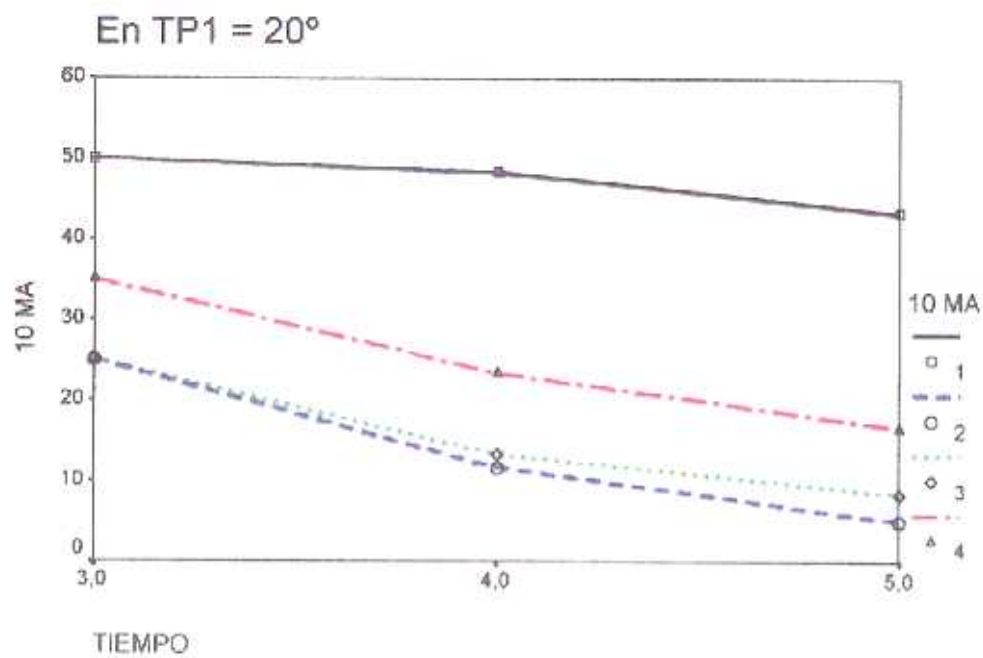


Fig.- 182. Suero a 20°C

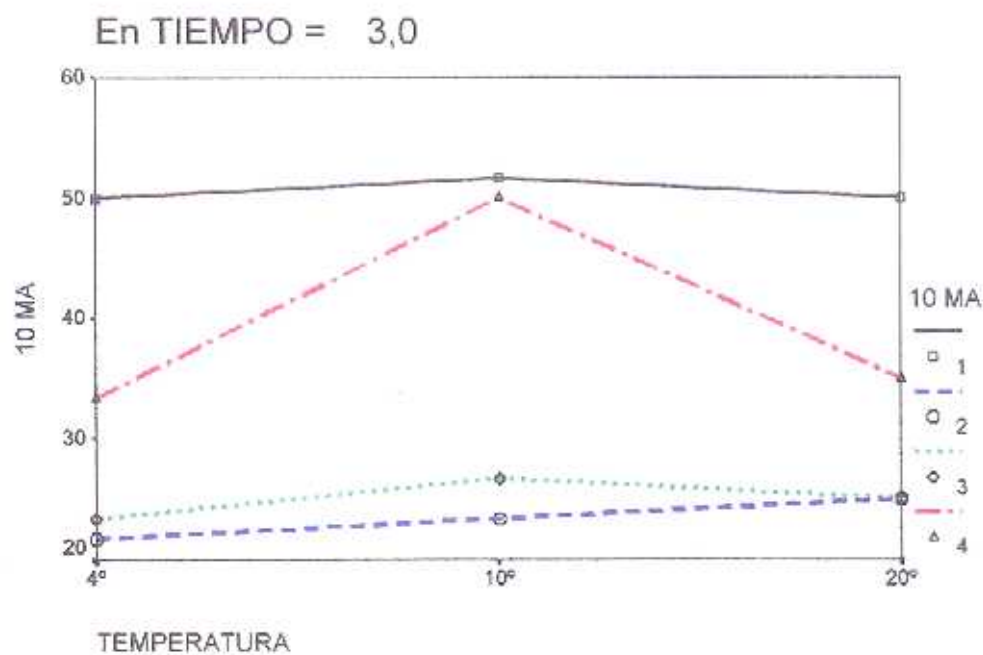


Fig.- 183. Isquemia de 3 h.

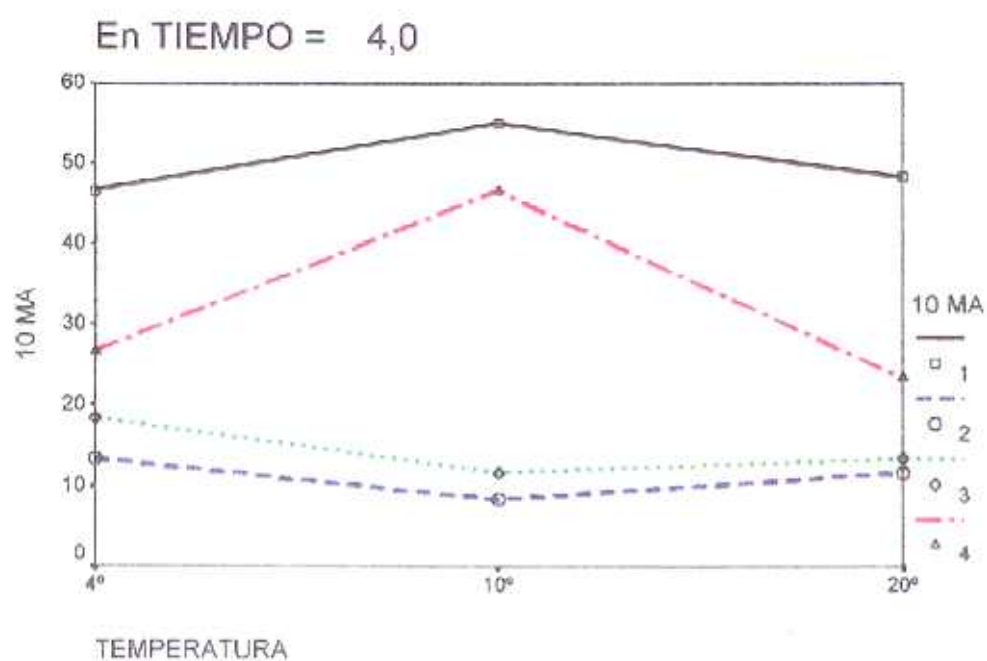


Fig.- 184. Isquemia de 4 h.

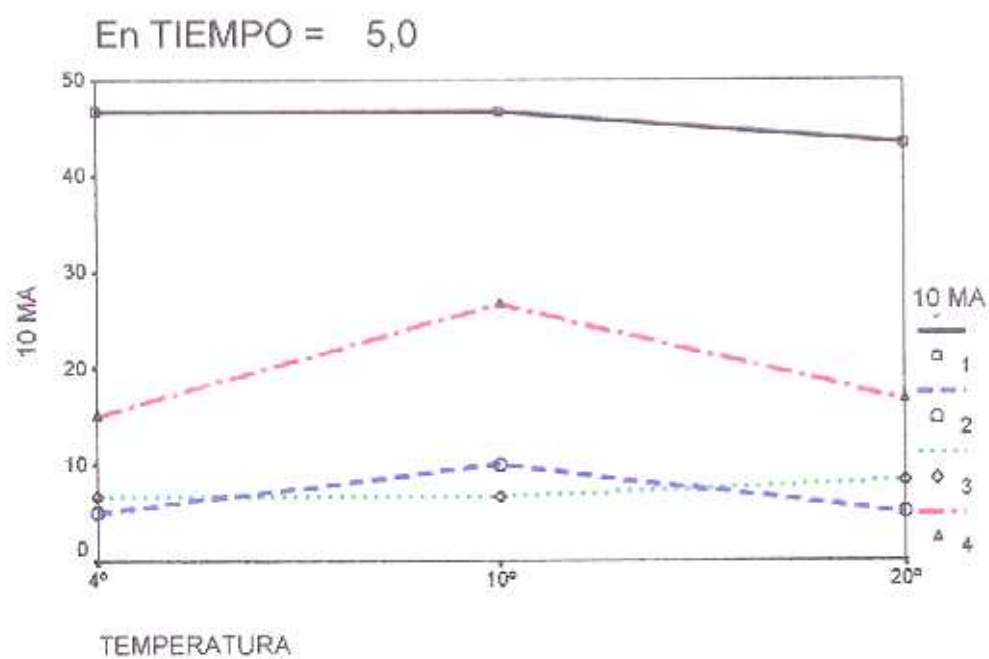


Fig.- 185. Isquemia de 5 h.

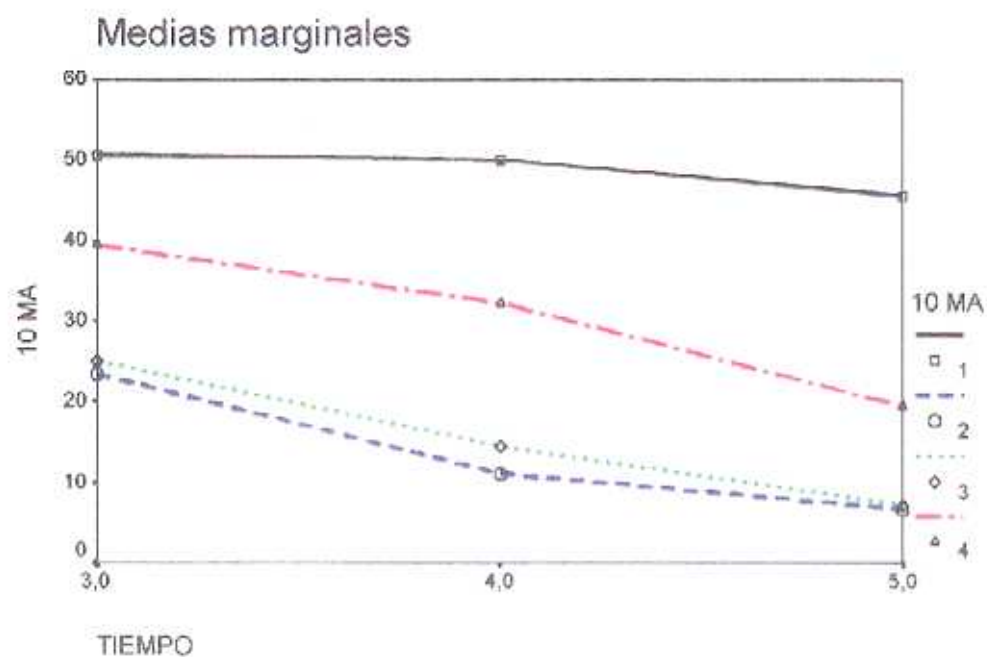


Fig.- 186. Tiempos de isquemia.

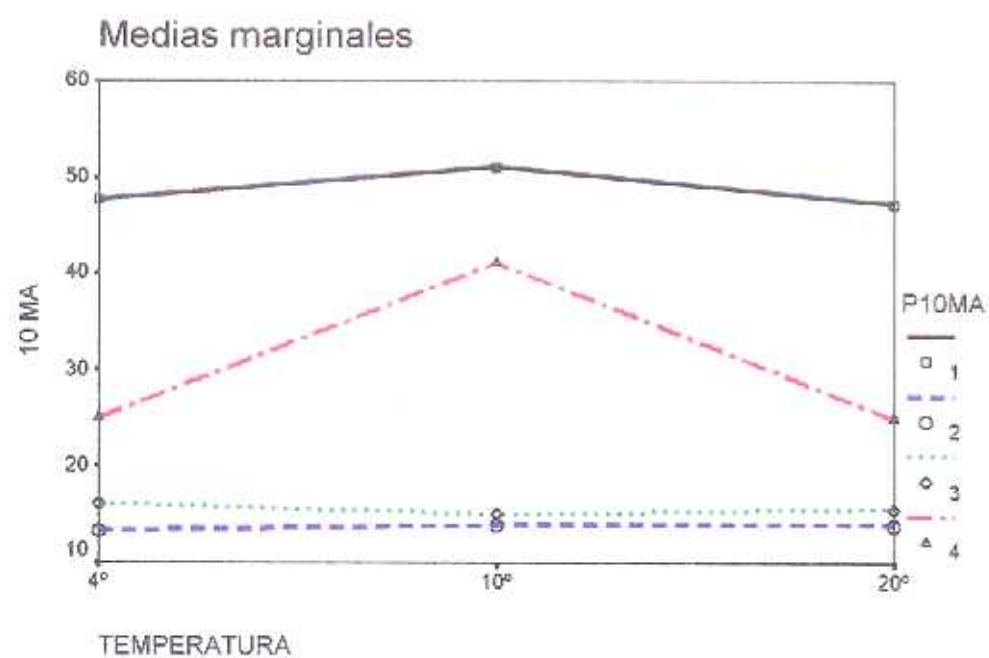


Fig.- 187. Temperaturas de perfusión

TABLA – XXXVII: Pruebas de efectos intra-sujetos.

Medida:

Esfericidad asumida

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
P10MA	21334,028	3	7111,343	315,627	,000	946,880	1,000
P10MA * TIEMPO	784,722	6	130,787	5,805	,000	34,829	,995
P10MA * TP1	1093,056	6	182,176	8,086	,000	48,514	1,000
P10MA * TIEMPO * TP1	352,778	12	29,398	1,305	,243	15,658	,647
Error(P10MA)	1216,667	54	22,531				

a. Calculado con alfa = ,05

TABLA – XXXVIII: Pruebas de los efectos inter-sujetos

Medida:

Variable transformada: Promedio

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
Intercept	19804,688	1	19804,688	1096,875	,000	1096,875	1,000
TIEMPO	994,097	2	497,049	27,529	,000	55,058	1,000
TP1	137,847	2	68,924	3,817	,041	7,635	,617
TIEMPO * TP1	11,806	4	2,951	,163	,954	,654	,077
Error	325,000	18	18,056				

a. Calculado con alfa = ,05

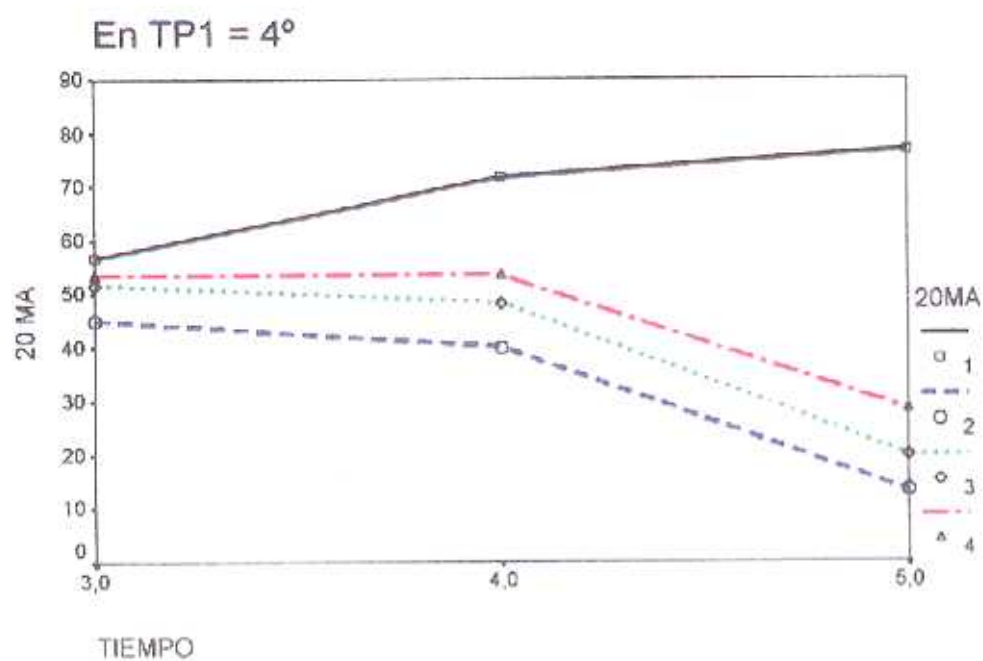


Fig.- 188. Suero a 4°C

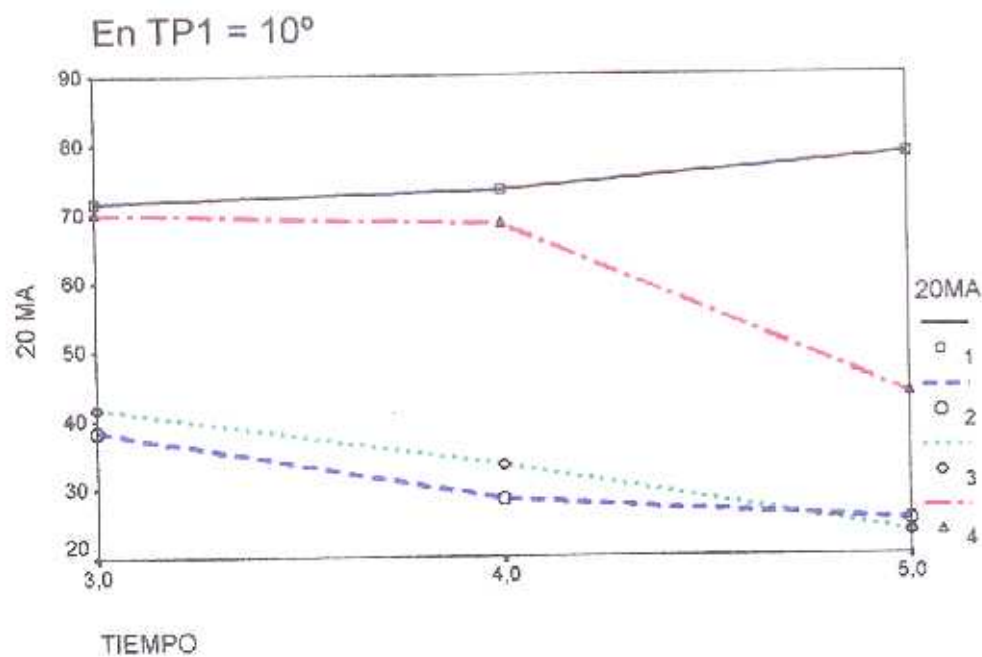


Fig.- 189. Suero a 10°C

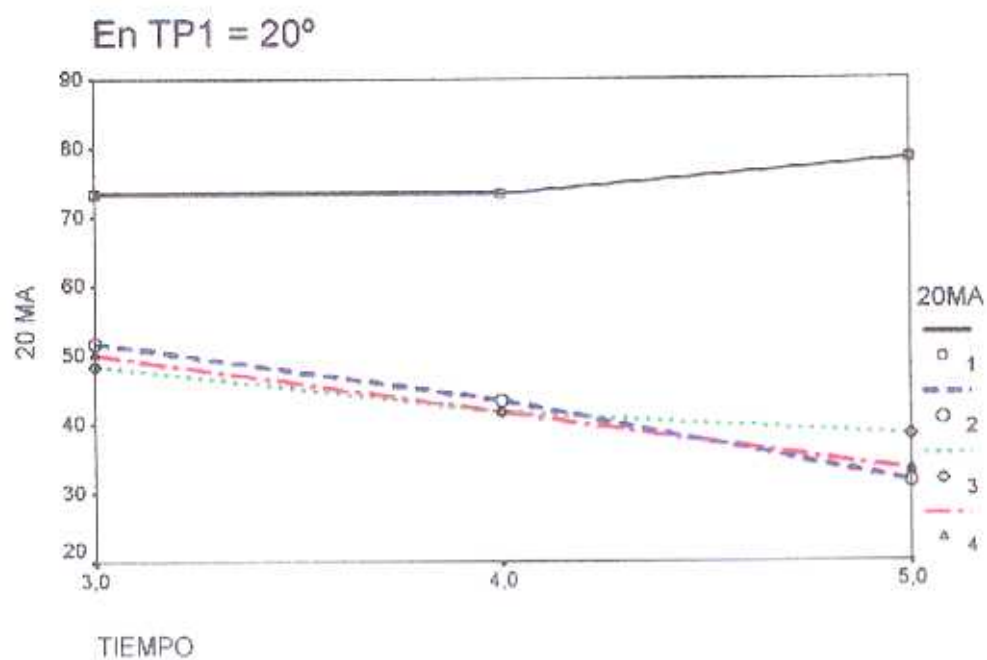


Fig.- 190. Suero a 20°C

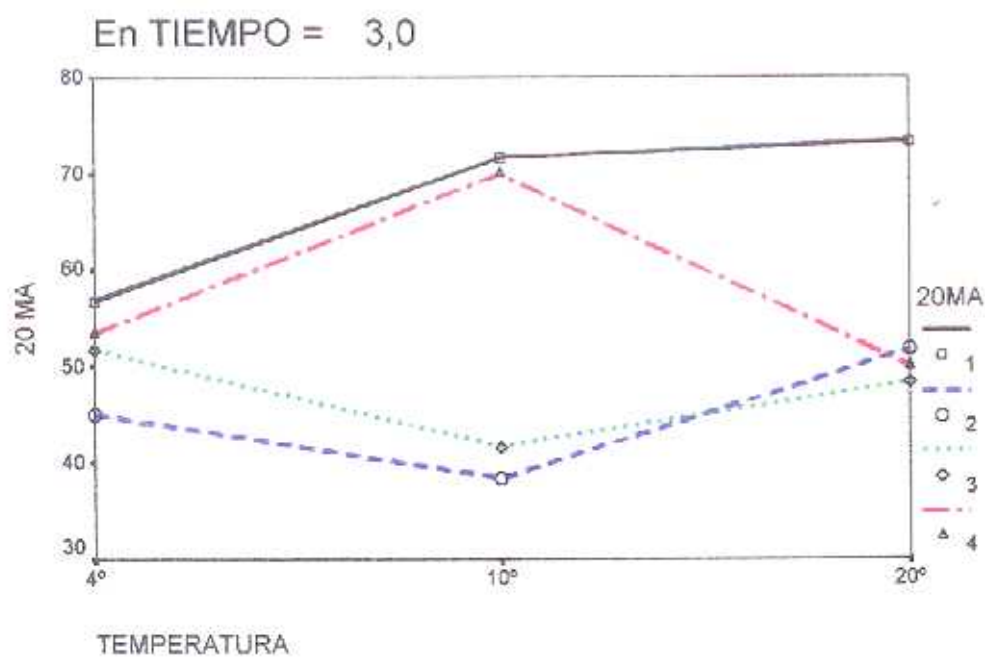


Fig.- 191. Isquemia de 3 h.

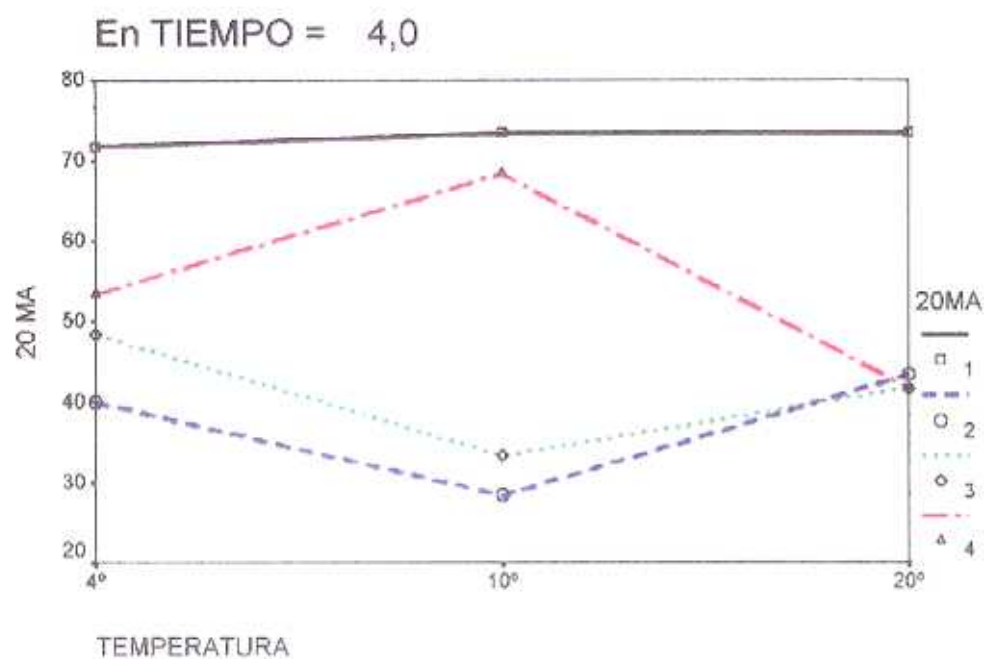


Fig.- 192. Isquemia de 4 h.

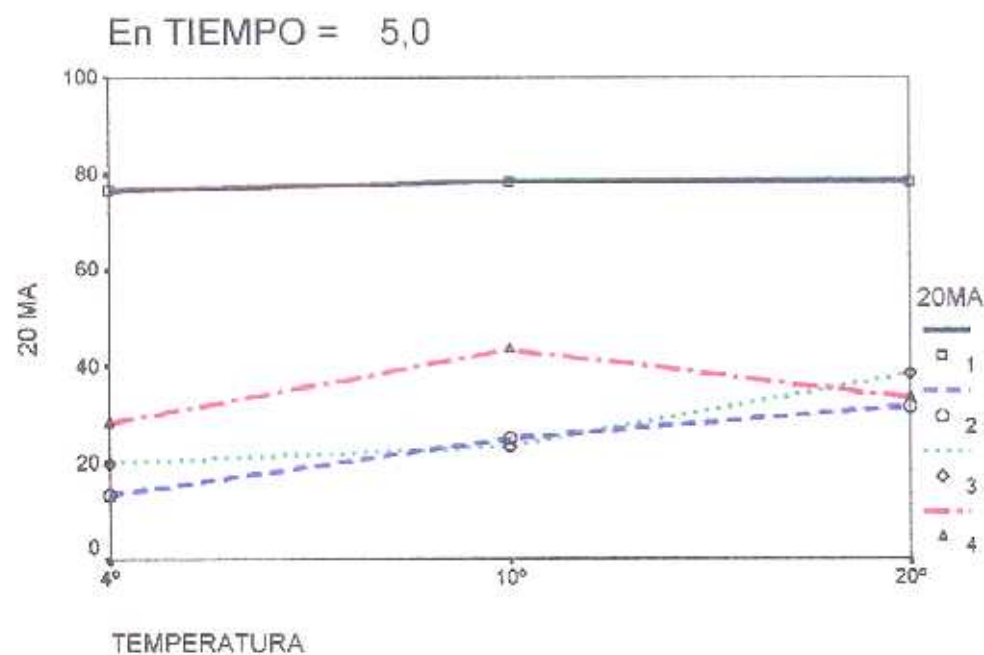


Fig.- 193. Isquemia de 5 h.

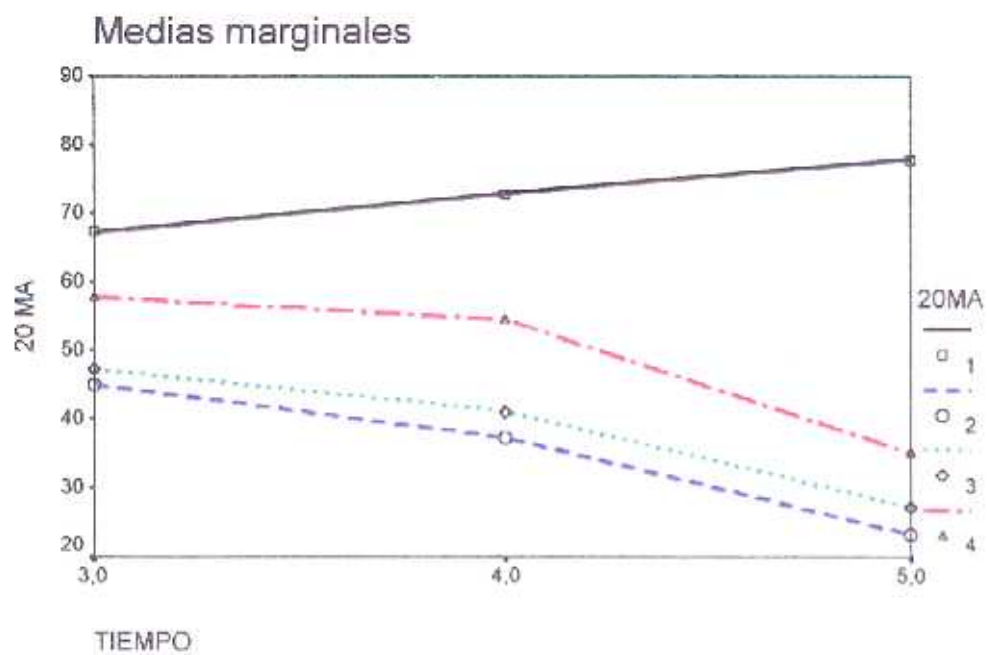


Fig.- 194. Tiempos de isquemia.

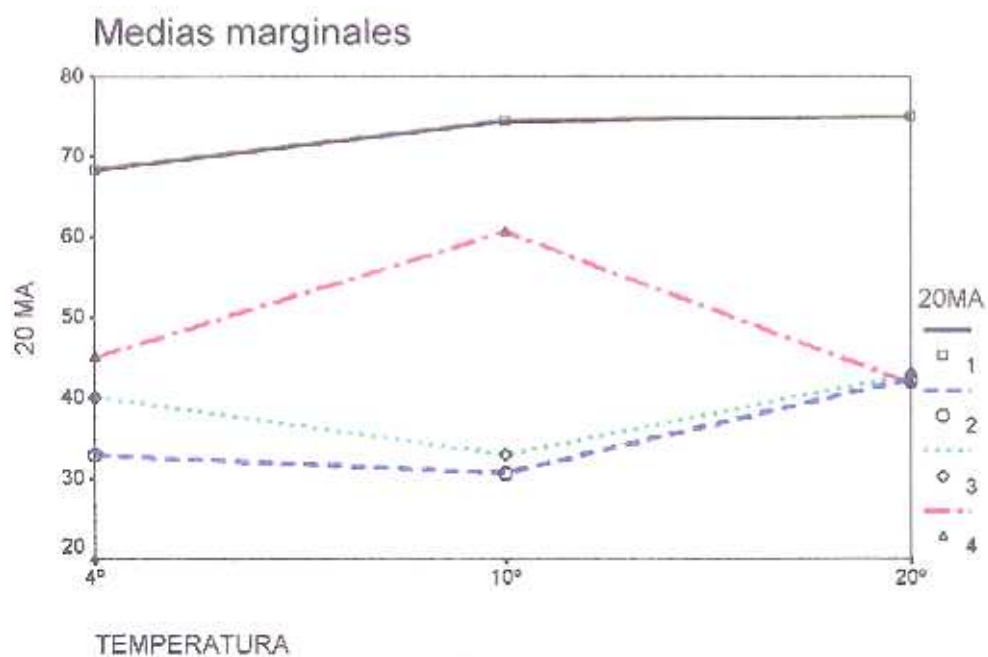


Fig.- 195. Temperaturas de perfusión

TABLA – XII: Pruebas de efectos intra-sujetos.

Medida:

Esfericidad asumida

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
P20MA	23145,139	3	7715,046	225,704	,000	677,113	1,000
P20MA * TIEMPO	3668,056	6	611,343	17,885	,000	107,309	1,000
P20MA * TP1	2944,444	6	490,741	14,357	,000	86,140	1,000
P20MA * TIEMPO * TP1	952,778	12	79,398	2,323	,018	27,874	,920
Error(P20MA)	1845,833	54	34,182				

a. Calculado con alfa = ,05

TABLA – XI: Pruebas de los efectos Inter-sujetos

Medida:

Variable transformada: Promedio

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
Intercept	64411,169	1	64411,169	1780,840	,000	1780,840	1,000
TIEMPO	904,282	2	452,141	12,501	,000	25,002	,989
TP1	75,463	2	37,731	1,043	,373	2,086	,204
TIEMPO * TP1	162,731	4	40,683	1,125	,376	4,499	,282
Error	651,042	18	36,169				

a. Calculado con alfa = ,05

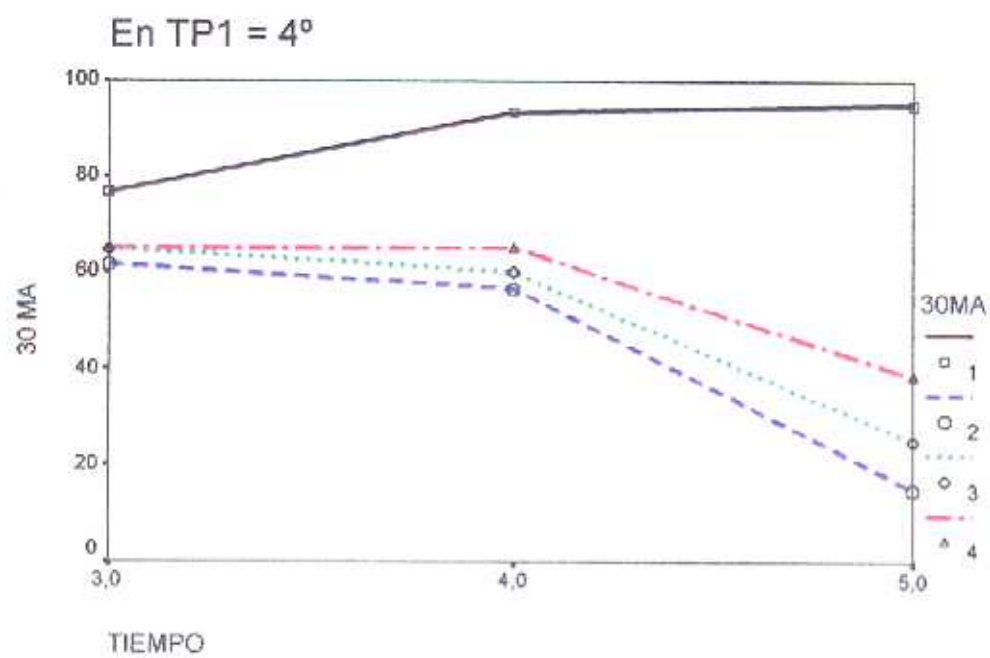


Fig.- 196. Suero a 4°C

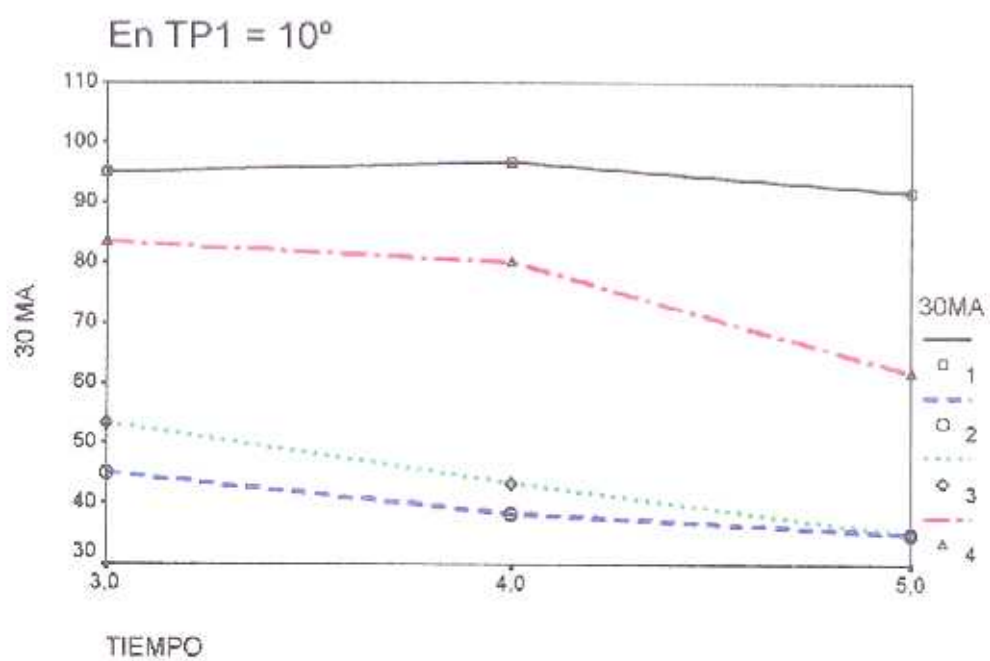


Fig.- 197. Suero a 10°C

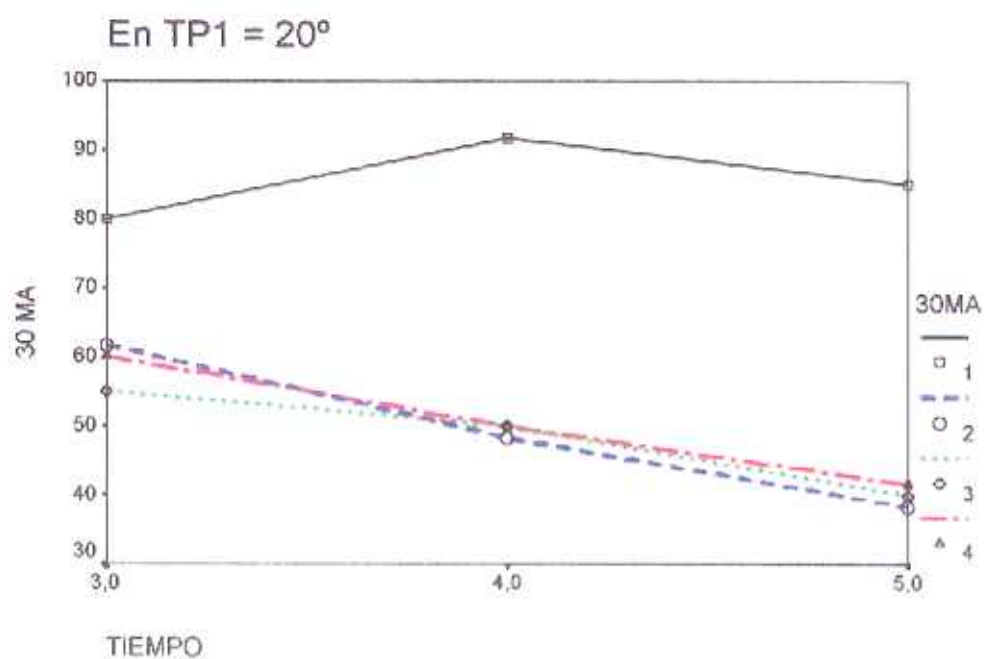


Fig.- 198. Suero a 20°C

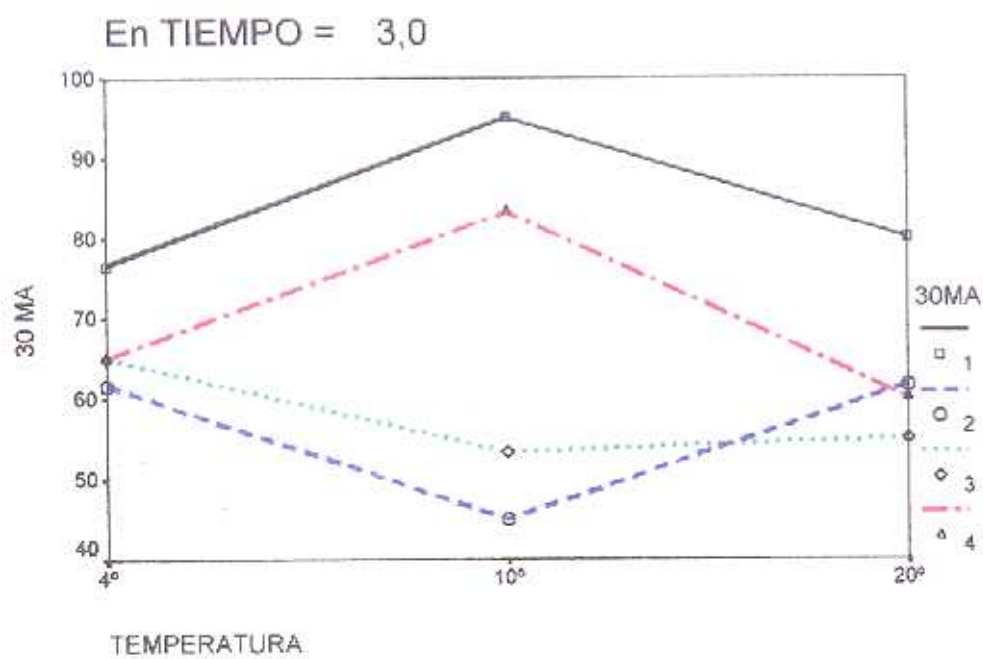


Fig.- 199. Isquemia de 3 h.

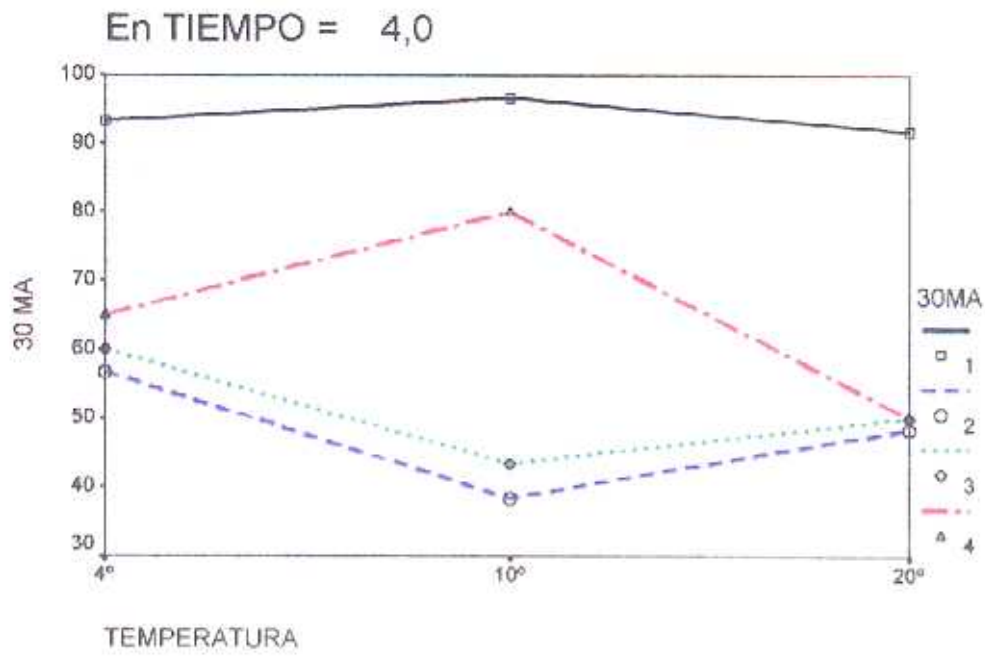


Fig.- 200. Isquemia de 4 h.

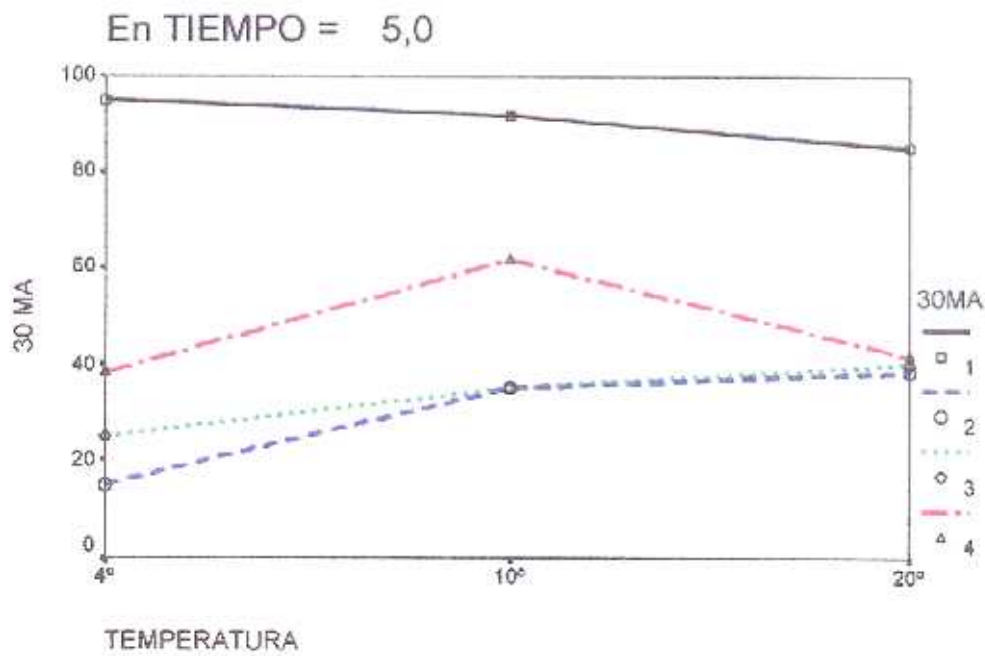


Fig.- 201. Isquemia de 5 h.

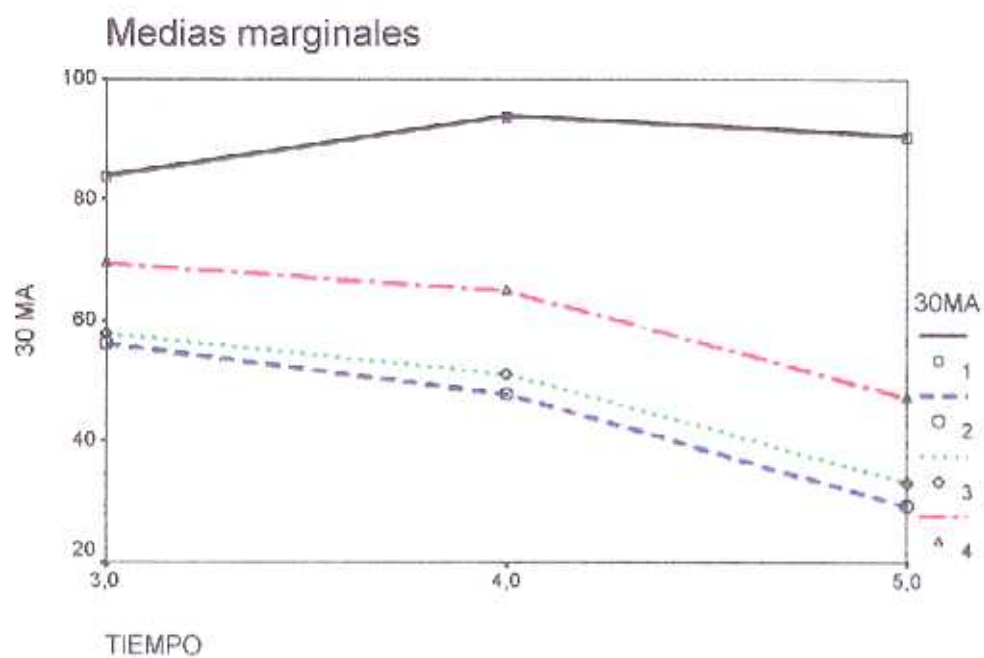


Fig.- 202. Tiempos de isquemia.

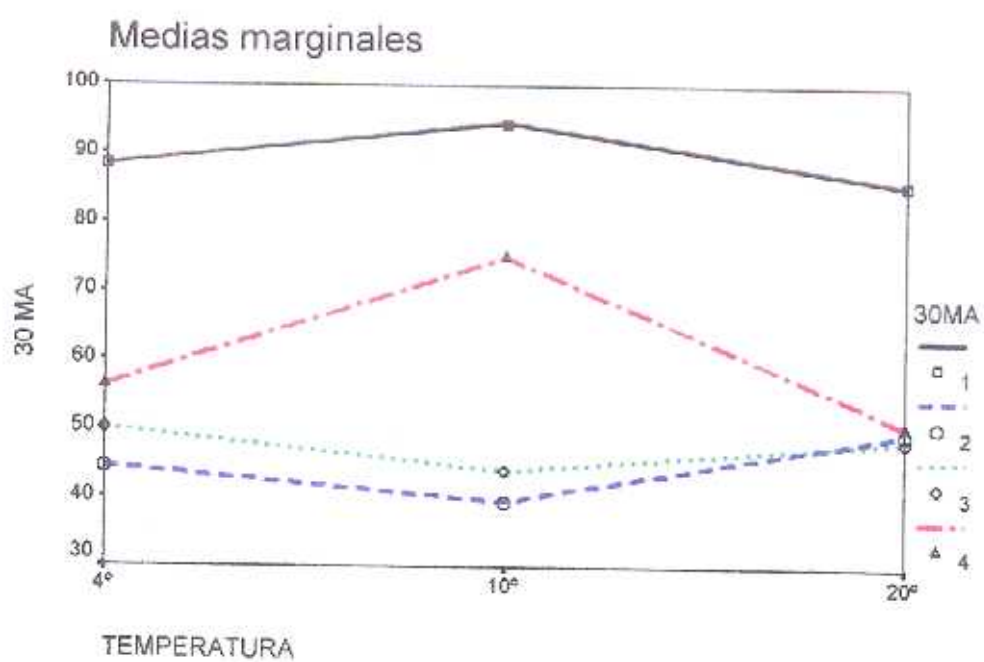


Fig.- 203. Temperaturas de perfusión

TABLA – XLI: Pruebas de efectos intra-sujetos.

Medida:

Esfericidad asumida

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
P30MA	34208,333	3	11402,778	280,417	,000	841,252	1,000
P30MA * TIEMPO	3323,611	6	553,935	13,622	,000	81,734	1,000
P30MA * TP1	3526,389	6	587,731	14,454	,000	86,721	1,000
P30MA * TIEMPO * TP1	1908,333	12	159,028	3,911	,000	46,930	,996
Error(P30MA)	2195,833	54	40,664				

a. Calculado con alfa = ,05

TABLA – XLII: Pruebas de los efectos inter-sujetos

Medida:

Variable transformada: Promedio

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
Intercept	98705,787	1	98705,787	1383,322	,000	1383,322	1,000
TIEMPO	1464,005	2	732,002	10,259	,001	20,517	,969
TP1	107,755	2	53,877	,755	,484	1,510	,158
TIEMPO * TP1	284,954	4	71,238	,998	,434	3,994	,253
Error	1284,375	18	71,354				

a. Calculado con alfa = ,05

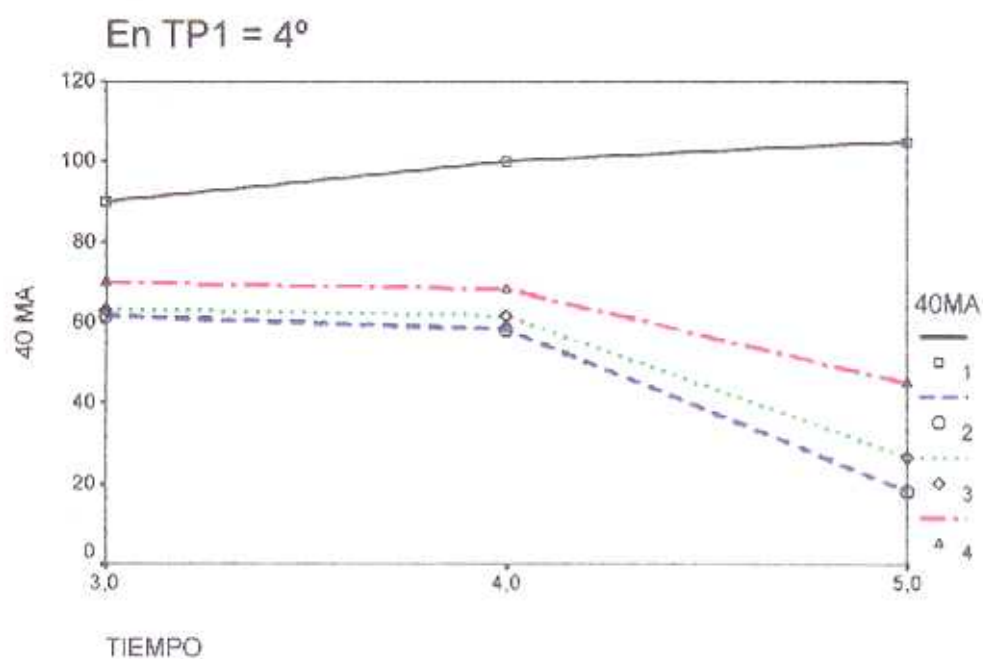


Fig.- 204. Suero a 4°C

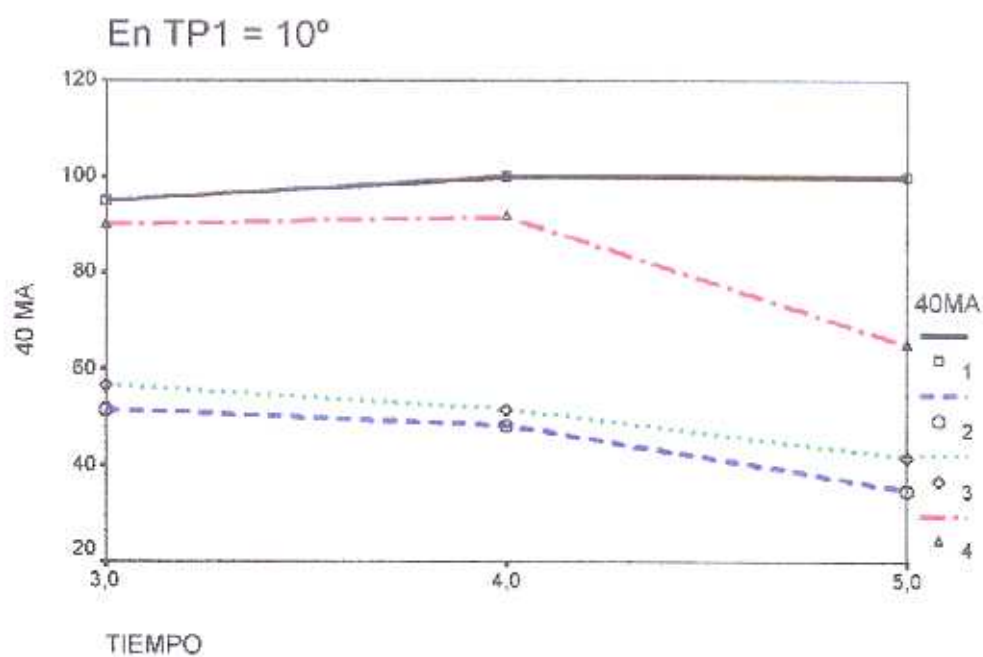


Fig.- 205. Suero a 10°C

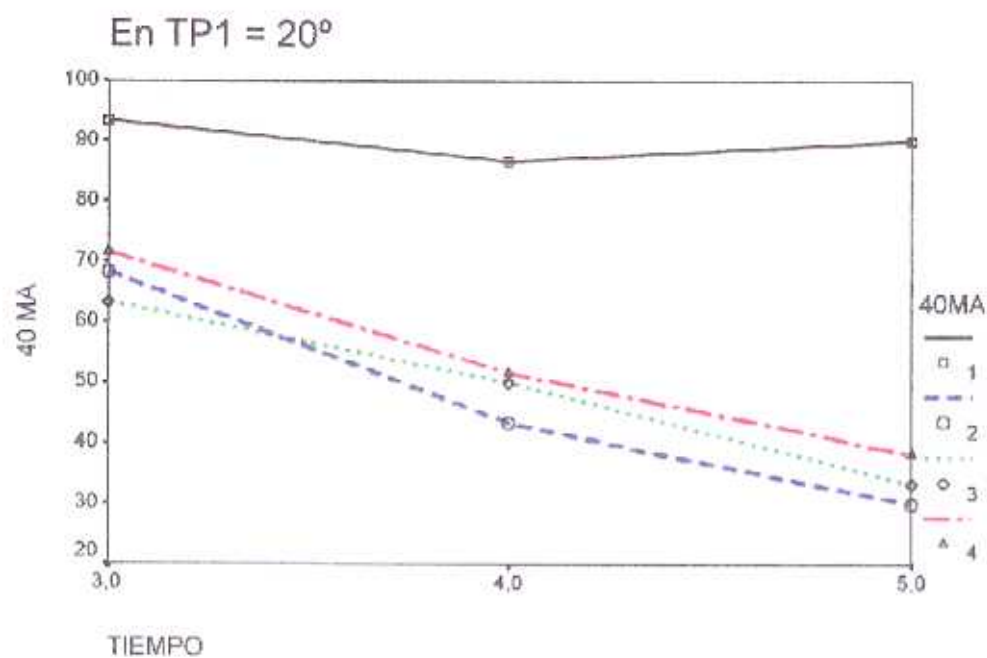


Fig.- 206. Suero a 20°C

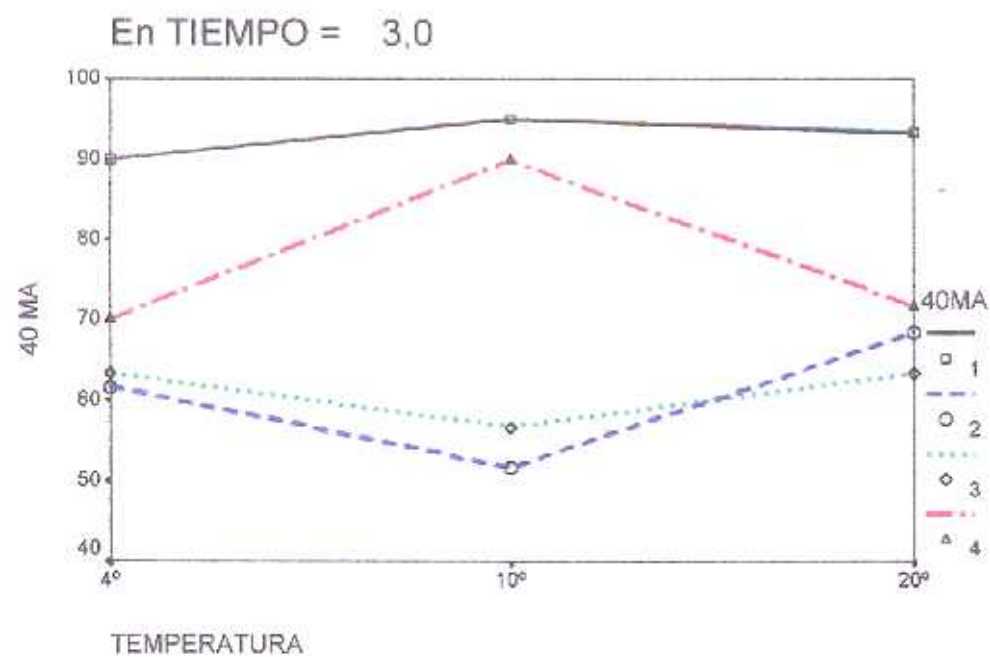


Fig.- 207. Isquemia de 3 h.

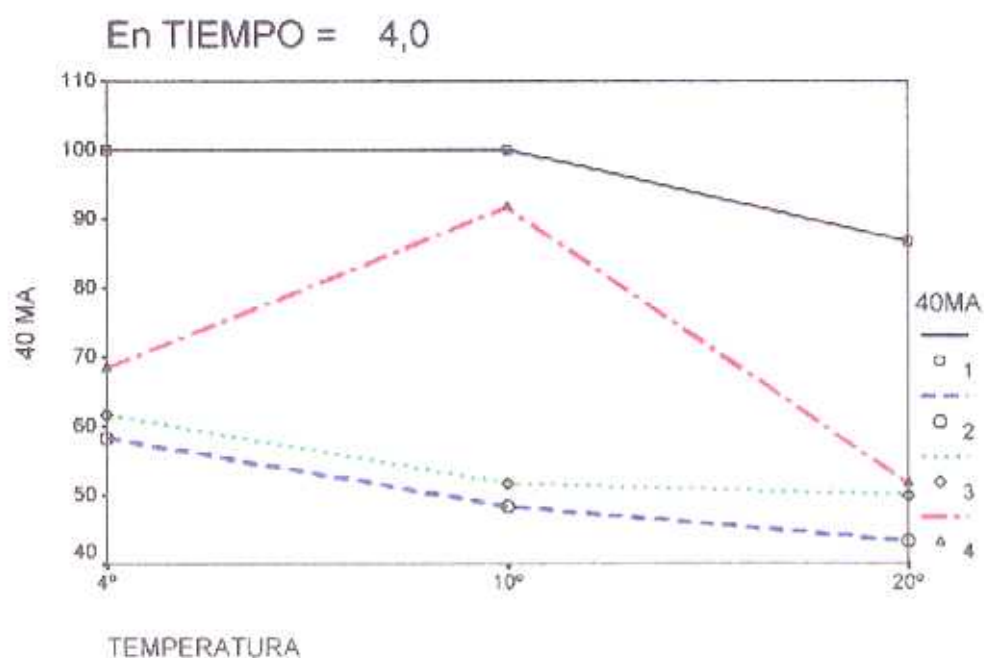


Fig.- 208. Isquemia de 4 h.

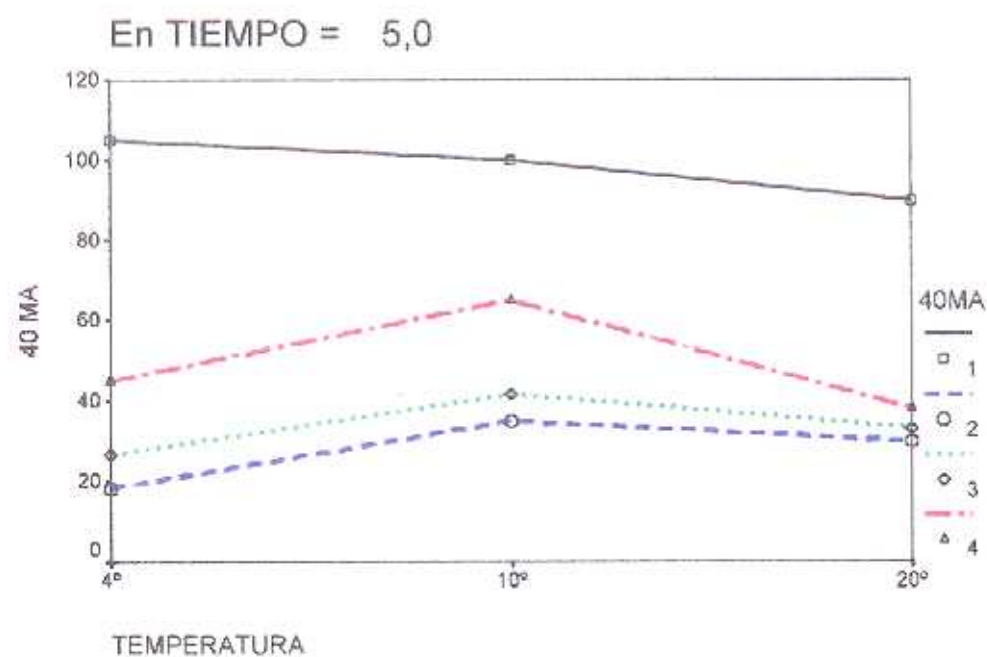


Fig.- 209. Isquemia de 5 h.

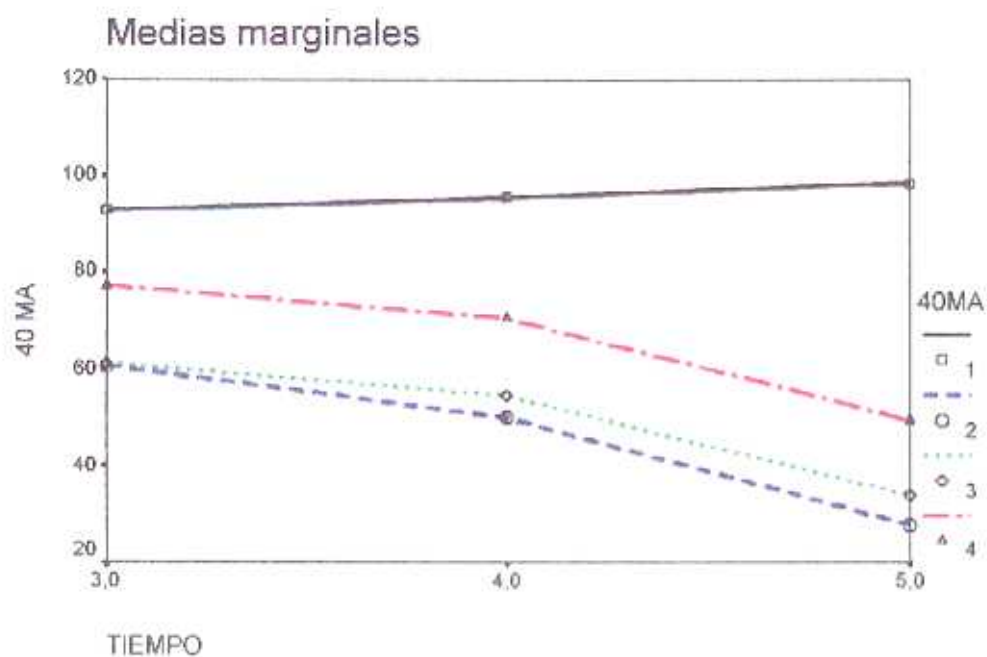


Fig.- 210. Tiempos de isquemia.

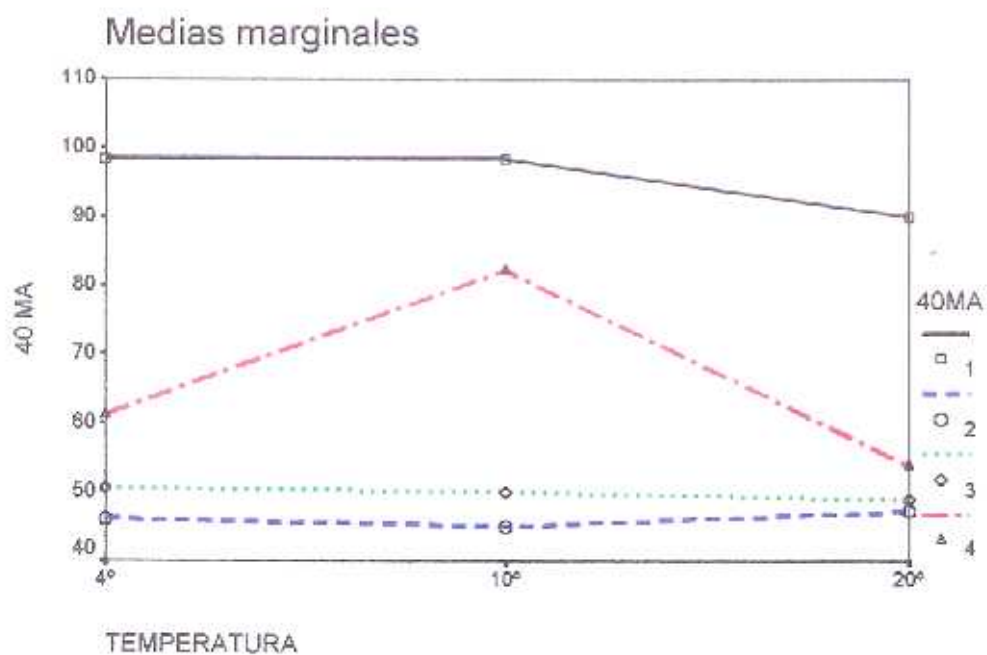


Fig.- 211. Temperaturas de perfusión

TABLA – XLIII: Pruebas de efectos intra-sujetos.

Medida:

Esfericidad asumida

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
P40MA	41030,324	3	13676,775	747,895	,000	2243,684	1,000
P40MA * TIEMPO	4381,481	6	730,247	39,932	,000	239,595	1,000
P40MA * TP1	2927,315	6	487,886	26,679	,000	160,076	1,000
P40MA * TIEMPO * TP1	1079,630	12	89,969	4,920	,000	59,038	1,000
Error(P40MA)	987,500	54	18,287				

a. Calculado con alfa = ,05

TABLA – XLIV: Pruebas de los efectos inter-sujetos

Medida:

Variable transformada: Promedio

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
Intercept	111650,521	1	111650,521	1428,069	,000	1428,069	1,000
TIEMPO	2051,389	2	1025,694	13,119	,000	26,238	,992
TP1	356,597	2	178,299	2,281	,131	4,561	,402
TIEMPO * TP1	376,389	4	94,097	1,204	,343	4,814	,301
Error	1407,292	18	78,183				

a. Calculado con alfa = ,05

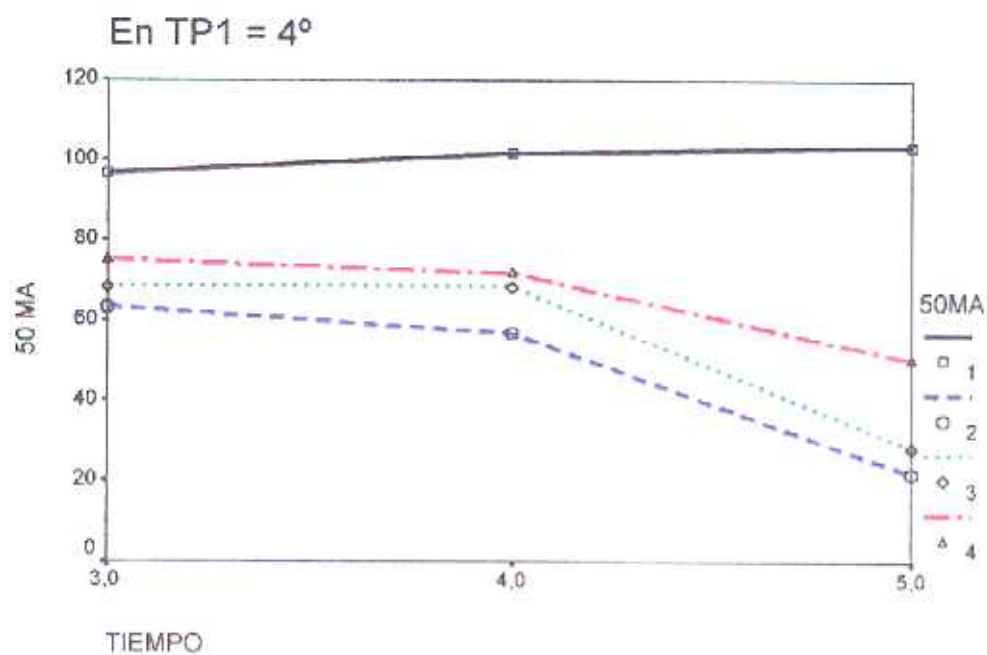


Fig.- 212. Suero a 4°C

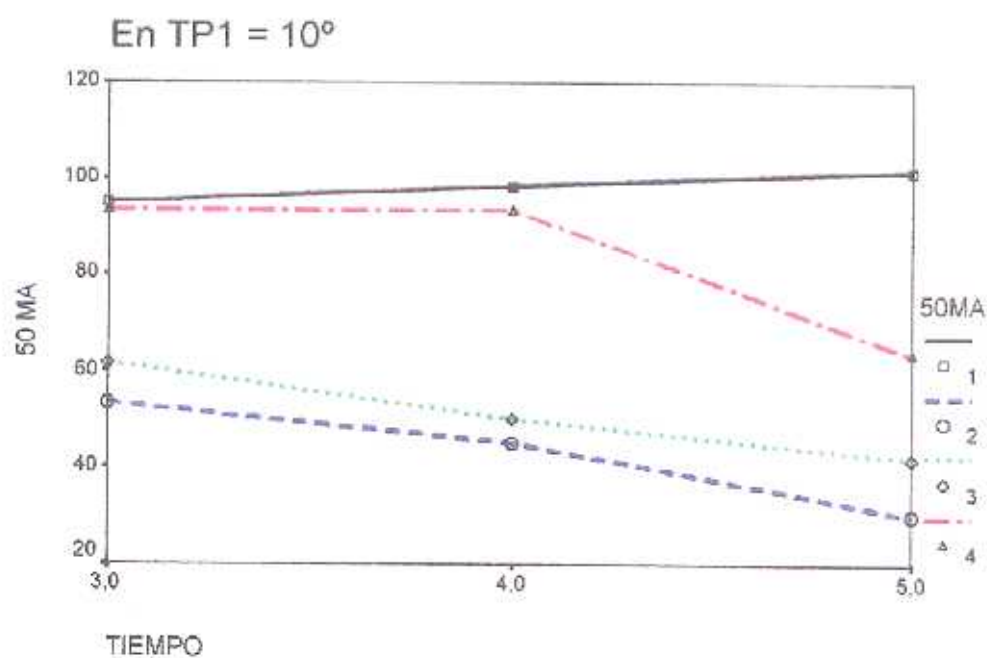


Fig.- 213. Suero a 10°C

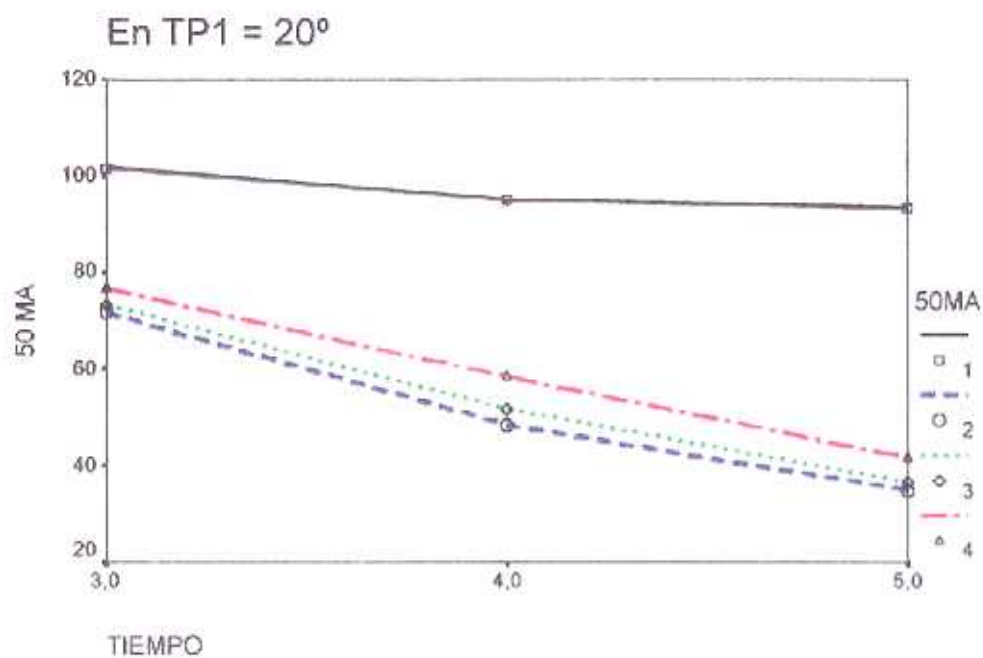


Fig.- 214. Suero a 20°C

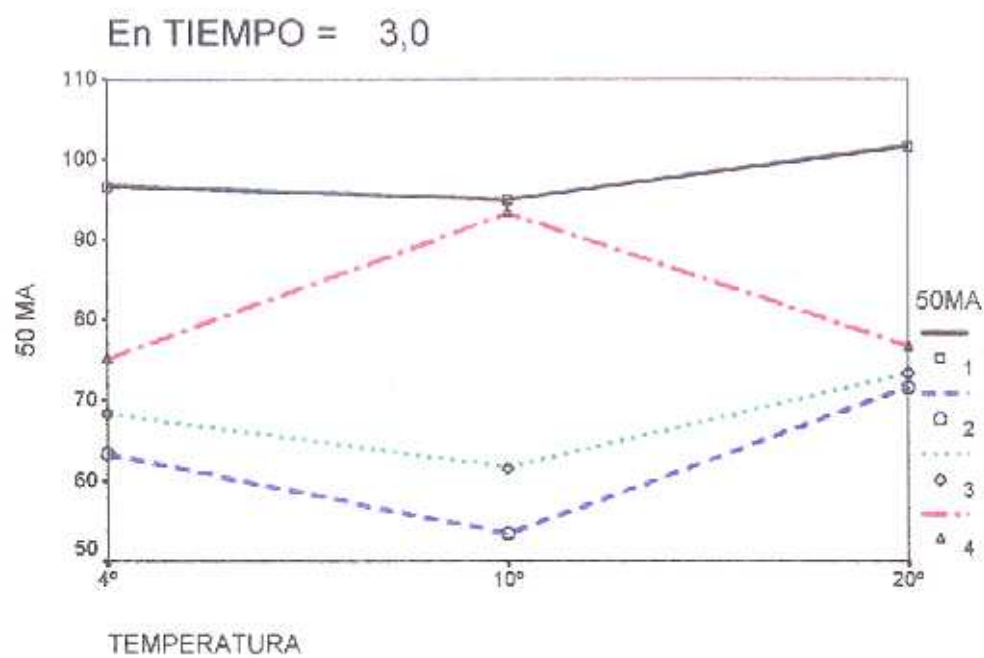


Fig.- 215. Isquemia de 3 h.

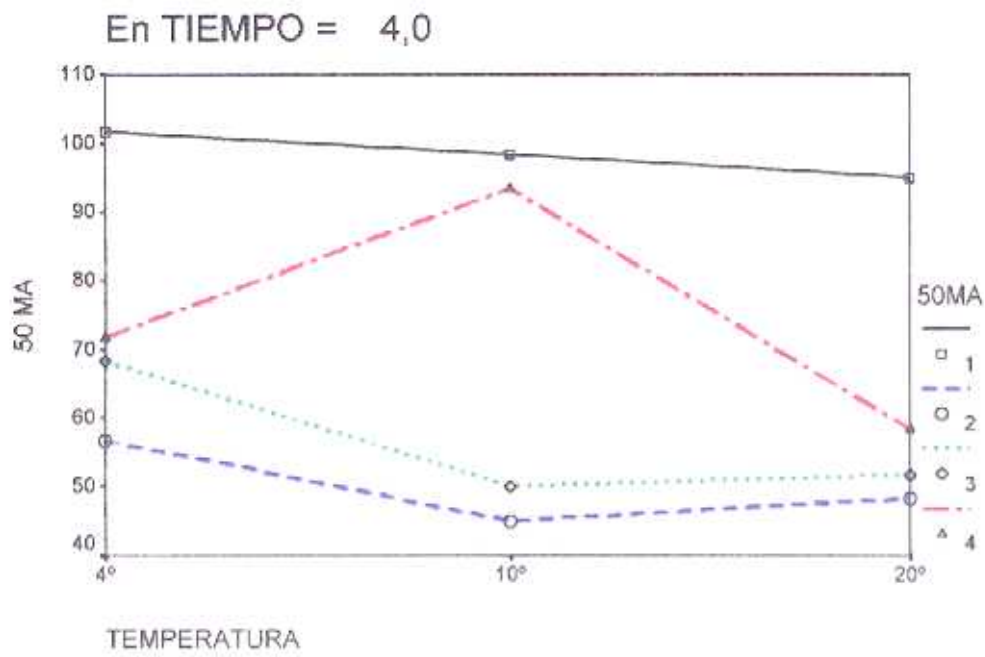


Fig.- 216. Isquemia de 4 h.

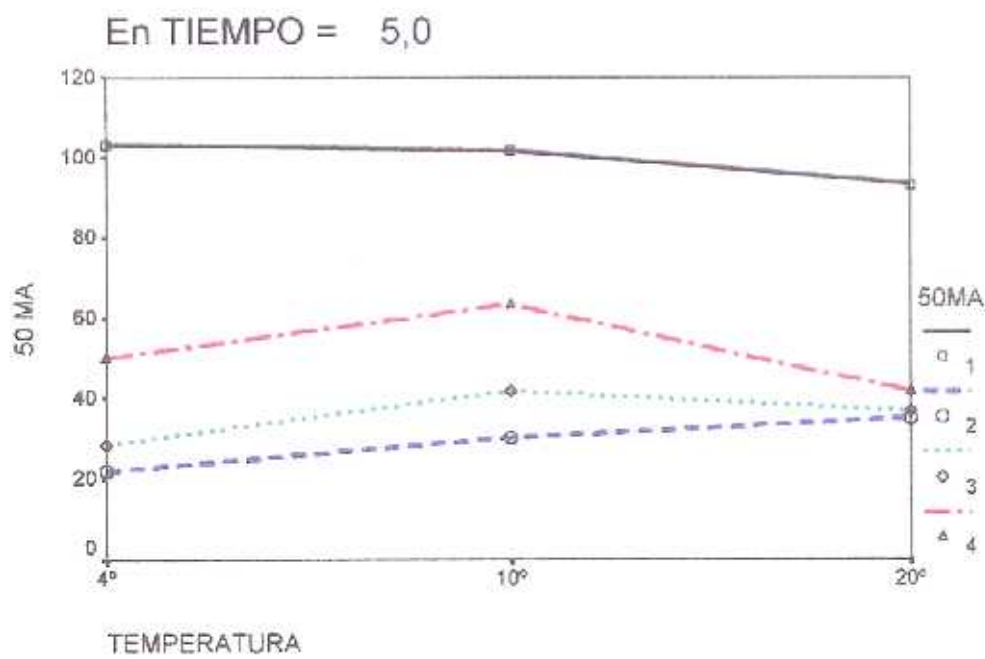


Fig.- 217. Isquemia de 5 h.

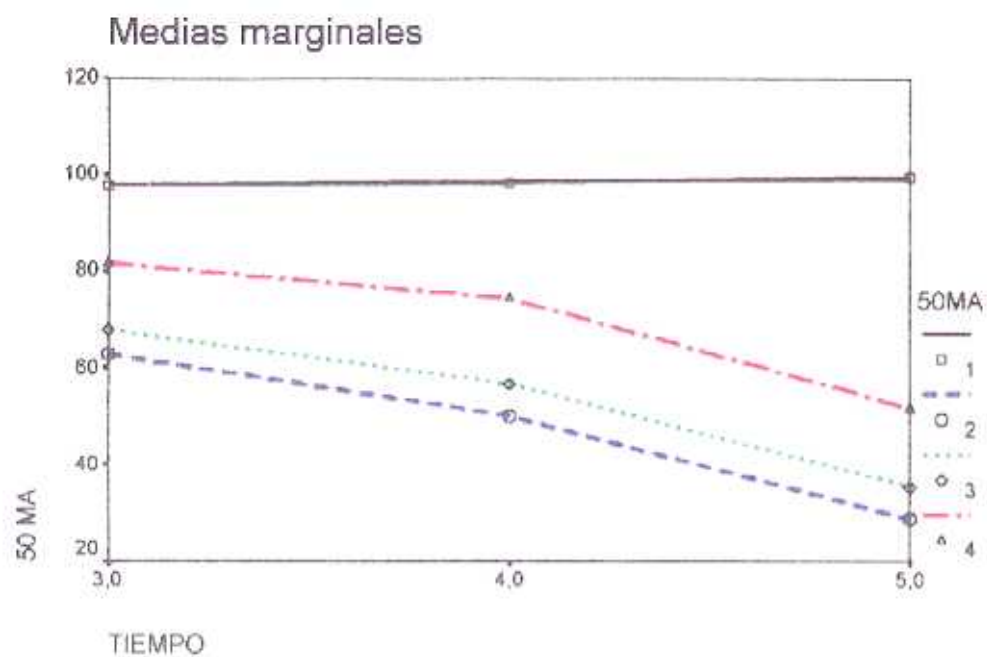


Fig.- 218. Tiempos de isquemia.

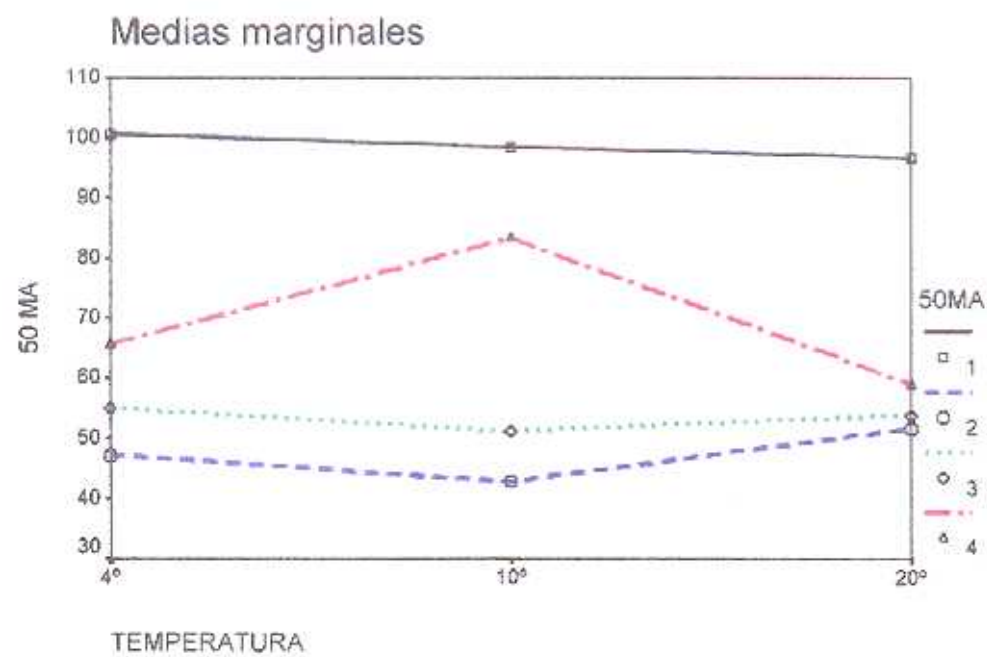


Fig.- 219. Temperaturas de perfusión

TABLA – XLV: Pruebas de efectos intra-sujetos.

Medida:

Esfericidad asumida

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
P50MA	42563,657	3	14187,886	693,868	,000	2081,604	1,000
P50MA * TIEMPO	4068,981	6	678,164	33,166	,000	198,996	1,000
P50MA * TP1	3135,648	6	522,608	25,558	,000	153,351	1,000
P50MA * TIEMPO * TP1	946,296	12	78,858	3,857	,000	46,279	,996
Error(P50MA)	1104,167	54	20,448				

a. Calculado con alfa = ,05

TABLA – XLVI: Pruebas de los efectos inter-sujetos

Medida:

Variable transformada: Promedio

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
Intercept	121504,687	1	121504,687	1587,000	,000	1587,000	1,000
TIEMPO	2612,847	2	1306,424	17,063	,000	34,127	,999
TP1	58,681	2	29,340	,383	,687	,766	,102
TIEMPO * TP1	322,222	4	80,556	1,052	,408	4,209	,265
Error	1378,125	18	76,562				

a. Calculado con alfa = ,05

IV.- DISCUSIÓN

4.1. DISCUSIÓN

El reimplante o la revascularización de un segmento de un miembro que incluye una masa muscular importante puede ser un procedimiento peligroso e incluso representar un riesgo vital para el paciente.

El éxito o el fracaso de cualquier reimplante está ligado de manera íntima al tiempo que ha permanecido en isquemia el tejido a reimplantar, y la supervivencia del tejido está en relación directa con la resistencia que presenta el tejido a la hipoxia, debido al metabolismo celular específico de cada tejido. Por ello, una de las preocupaciones más importantes del cirujano microvascular es el llamado tiempo de isquemia.

De todos los tejidos de las extremidades, el músculo es el menos tolerante a la isquemia (111,120,149) ya que la hipoxia produce una gran alteración del metabolismo celular, que se mantiene en anaerobiosis durante el tiempo que dura la isquemia (140,184). Durante el mismo, se produce un aumento de los productos ácidos derivados de este metabolismo y una pérdida de los fosfatos de alta energía (55,100,111).

Fué Volkmann (230), en 1881, el primero en sugerir que la contractura isquémica sucedía como resultado de una necrosis muscular y su posterior fibrosis.

Por ello, para conseguir el reimplante de un miembro con éxito, es decir, con buena funcionalidad, el tiempo de isquemia tiene que ser lo más corto posible (58,112,155), ya que hay un defecto en la producción de energía y una acidosis intracelular, evitando la necrosis muscular y la posible aparición de la toxemia del reimplante (falla múltiple de las funciones vitales) y un síndrome compartimental (aumento de la presión en los compartimentos musculares, asociado al edema postraumático y postanóxico) (140) cuando se restablece el flujo sanguíneo. En ellos, la viabilidad del músculo y la función neuro-muscular se ven comprometidas (111).

De ahí que se hayan realizado numerosos estudios encaminados a averiguar la tolerancia del músculo esquelético a la isquemia, sola o en combinación con otros métodos, tal como la aplicación de un torniquete (37,112,140), síndrome compartimental agudo (6,90,193), oclusión temporal de vasos (92,100), reimplantes (73,111,140), reperfusión (15,164,174), isquemia normotérmica e hipotérmica (20,94,167). Y diversos autores han comprobado que el deterioro metabólico y estructural del músculo esquelético en un síndrome compartimental agudo (147,148,173) es más severo que el observado al

aplicar un torniquete, durante el mismo tiempo, por la elevada presión (90).

Por ello, se ha elegido un modelo experimental que no ha utilizado torniquete ni provocado un síndrome compartimental, intentando remedar una lesión isquémica (amputación parcial) sin fenómenos añadidos, y se ha mantenido la extremidad en isquemia durante 3, 4 y 5 horas. Se ha aplicado un protocolo para la inducción rápida, pero no total, de hipotermia de la extremidad y el mantenimiento de la misma mediante la **hipotermia intermedia** ($10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).

La primera fase de nuestro protocolo para la conservación de las extremidades ha sido la perfusión con suero frío-helado ($4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). El tiempo necesario para que los músculos profundos del muslo de una extremidad de conejo alcancen la temperatura de 10°C es de 60 a 90 minutos. A continuación, se mantiene la extremidad irrigada con suero fisiológico a $10^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Numerosos investigadores (3,47,58) han demostrado que la conservación hipotérmica de miembros isquémicos prolonga la viabilidad del músculo esquelético isquémico (102,149,167) y disminuye la incidencia postoperatoria de la llamada toxemia del reimplante (90,118,221). Por lo general, se ha supuesto que el mecanismo mediante el cual la hipotermia ejerce sus efectos beneficiosos, en un tejido anóxico, es por una reducción de la actividad metabólica celular (49,79,102), así conserva reservas energéticas críticas y mantiene al mínimo el acúmulo de metabolitos tóxicos sobrantes (3,167,218).

En la década de 1930, Allen (3,4) realizó el primer estudio formal sobre los efectos de la temperatura en la tolerancia de los tejidos de las extremidades a la isquemia. Allen (3,4) postuló que con tal que los tejidos de miembros isquémicos no estuvieran realmente congelados, temperaturas de 1°C ó 2°C , se obtendrían los efectos más beneficiosos, debidos a un descenso de la actividad metabólica y en los requerimientos energéticos de los tejidos.

Que sepamos, revisando la literatura, la hipótesis de Allen (3,4) nunca ha sido confirmada ni desmentida, de forma específica, en lo que se refiere al músculo esquelético.

Los métodos descritos más recientes sobre la conservación de tejidos, antes del reimplante de la extremidad (149,184,221), en lo básico son una reiteración del método de inmersión en agua helada que propuso Allen (3,4) hace más de 50 años.

La hipotermia del tejido se considera beneficiosa para el mantenimiento de la viabilidad del músculo en miembros amputados, antes del reimplante quirúrgico, pero hay pocos estudios que establezcan qué tipo

de enfriamiento produce un nivel óptimo de hipotermia que reduzca al mínimo la alteración metabólica en el músculo isquémico (111,184).

Desde un punto de vista metabólico, el método óptimo para el enfriamiento de amputaciones amplias de extremidades es aquel que disminuya la temperatura inicial de los tejidos profundos, 36°C, hasta los 10°C a 15°C de la manera más rápida posible y que, luego, mantenga la temperatura cerca de los 10°C (184).

Este protocolo de hipotermia tisular está ideado sólo para la conservación de segmentos de extremidades amputadas que contengan una cantidad considerable de tejido muscular. No hay razón para creer que cualquier fenómeno metabólico que sea equivalente al observado en este estudio suceda en otros tejidos de las extremidades; así, no hay ventajas aparentes en utilizar este protocolo para la conservación de dedos amputados. Su uso en amputaciones más proximales retrasará el deterioro metabólico del músculo isquémico, mucho mejor que lo haría la inmersión continua en un baño helado o sus equivalentes (184).

Es por lo que se ha elegido el método de la hipotermia intermedia, enfriamiento rápido de la extremidad con suero a 4°C y posterior mantenimiento con suero a 10°C, y su comparación con otros métodos de enfriamiento, pudiendo comprobar como este método de enfriamiento es el óptimo para la conservación de las extremidades. En todos los experimentos realizados, la utilización de este método de hipotermia ha mostrado los mejores resultados con los tres tiempos de isquemia, comparándolo con el suero a 4°C y 20°C.

Para conseguir un enfriamiento homogéneo en los tres grupos, en los tiempos de isquemia de 3 horas se ha perfundido suero a 4°C durante 60 minutos; en isquemias de 4 horas durante 75 minutos, y en las isquemias de 5 horas durante 90 minutos.

Experimentos previos con segmentos de extremidades de animales, envueltos en plástico dentro de un baño helado, han revelado que el tiempo necesario para descender la temperatura de los músculos profundos de 36°C a 15°C variaba con cada especie y con los tamaños de las amputaciones.

Los tiempos de inmersión que necesitan las amputaciones realizadas a distinto nivel en la extremidad superior humana son:

Muñeca: 20 minutos; Mitad del Antebrazo: 30 minutos;

Codo: 60 minutos; Mitad del Brazo: 90 minutos.

El tiempo requerido para alcanzar los 10°C ha sido un 50% mayor (184).

El enfriamiento rápido de la extremidad con suero a 4°C se debe a que el periodo inicial de enfriamiento es crítico, ya que la mayor parte de la reserva de fosfatos de alta energía del músculo es depleccionada dentro de la primera hora de isquemia si el enfriamiento es lento (111).

Los resultados obtenidos con el método de la hipotermia intermedia en este experimento no están de acuerdo con los conseguidos por Kihira (111) enfriando la extremidad sólo con solución Euro-Collins a 4°C, así como con los de otros autores que mantienen las extremidades en baño helado, con temperaturas de 0°C a 1°C (221). Y sí están en consonancia con los descubrimientos de Swartz (212), Osterman (155) y Sapega (184), al no encontrar diferencias entre la conservación a temperatura ambiente (22°C) y el enfriamiento convencional en hielo (1°C).

Esto, sugiere la posibilidad que la hipotermia del tejido con 1°C podría ser demasiado fría para la conservación de la energía suficiente por la maquinaria metabólica celular. Quizás, por el enfriamiento extremo, se dispara un proceso que consume ATP, lo cual no ocurriría con una alteración menos intensa de la temperatura. Esto tendría importantes implicaciones para la conservación de miembros isquémicos, porque a diferencia del cerebro, el riñón o el hígado, el músculo no puede tolerar deplecciones severas de ATP como resultado de una isquemia (65,90,172).

Hadju (77), en 1951, observó que cuando el músculo diafragma extirpado de una rata se congelaba a 0°C se contraía y desarrollaba tensión, llamando a este fenómeno "contractura fría" y afirmó que "éste, explica porqué el músculo diafragma se deteriora mucho más rápido a 0°C que a temperatura ambiente, cuando se podía esperar el efecto contrario si nos basamos en fundamentos físicos".

Bendall (11,12) y Hill (94), en los años 70, redescubrieron en esencia el fenómeno que había descrito Hadju (77), y se le llamó "tensión fría", después de determinar que la actividad de los miofilamentos inducida por el frío no era debida a la despolarización hipotérmica de la membrana. Hill (94) formuló la hipótesis según la cual el frío extremo permitiría al Ca^{2+} salir desde el retículo sarcoplásmico a las miofibrillas, mediante la inhibición de la bomba de calcio de la membrana del retículo sarcoplásmico, estimulando la ATP-asa de las miofibrillas, que hidroliza el ATP, y así causar una contracción muscular

activa consumiendo energía. Hecho confirmado por Locker (129), Sapega (184), etc.

Bendall et al (11,12) han informado que el comienzo del rigor mortis (indicado por una casi completa deplección de ATP) en el músculo esquelético de los mamíferos, que habían sido extirpados en fresco, se puede retrasar unas 2,5 veces si la temperatura del tejido se reduce de 37°C a 17°C. Por contra, no se hayó diferencia en el tiempo del rigor mortis, o era mínima, entre la conservación a temperatura ambiente y a 0°C.

Diversos estudios, realizados desde entonces, han demostrado que si se disminuye la temperatura de las fibras musculares esqueléticas de los mamíferos por debajo de los 15°C se produce un aumento en el nivel del Ca^{2+} libre sarcoplásmico (32,104,105). Cuando la temperatura es superior a los 5°C la cantidad de Ca^{2+} libre alrededor de la miofibrilla permanece baja, elevándose muy rápido cuando la temperatura se aproxima a 0°C (12,45,184) y sigue aumentando a medida que continúa la exposición al frío. La mayor cantidad de Ca^{2+} libre sarcoplásmico, con temperaturas inferiores a 5°C, activa la ATP-asa miofibrilar, causando una degradación considerable de ATP (11,12,32) y un aumento de la glucólisis, con deplección de glucógeno y aumento de sus metabolitos (32,62,184), que finaliza en una contracción muscular. Las mitocondrias del músculo esquelético no liberan el Ca^{2+} almacenado en ellas en dichas condiciones (141), lo que confirma al retículo sarcoplásmico como la fuente de salida del Ca^{2+} hacia la miofibrilla provocado por el frío (35,104,105). Y el nivel de Ca^{2+} libre sarcoplásmico se relaciona de manera lineal con el porcentaje de acortamiento activo producido en el músculo (45).

Se ha descubierto que la contracción por frío, del músculo esquelético, se produce en su mayor parte en los músculos rojos, en especies animales diferentes (12,77,94). Con las temperaturas más bajas, cercanas a la congelación, se desarrolla una contracción muscular intensa (53,104,129,141). Los estudios metabólicos de músculos isquémicos expuestos a hipotermia han mostrado que el aumento de la actividad contráctil se asocia, de manera clara, con una elevación de la velocidad de consumo de ATP (11,12,62) y una aceleración de la glucólisis (62,184).

Las fibras musculares blancas, fibras musculares de contracción rápida, al enfriarse en un baño helado, con 1°C de temperatura, manifiestan una contracción mínima por un lento descenso en la velocidad del metabolismo celular, en comparación con la isquemia a temperatura ambiente (12,94,129). En las fibras rojas, fibras musculares de contracción lenta, no es así (164).

En diversos estudios realizados comparando el consumo muscular de oxígeno con las temperaturas de los tejidos, no se señaló la presencia de una respuesta metabólica paradójica al frío extremo. Las razones pueden ser dos. Primera, la contracción por frío es mucho más marcada bajo condiciones de anaerobiosis (104,129,141). Segunda, como demostró Bendall (11), el consumo de oxígeno por el músculo en reposo indica una baja actividad metabólica de todas las células sólo cuando la temperatura está cerca de los 12°C. Por debajo de esta temperatura, el consumo de oxígeno continúa disminuyendo, a pesar de un aumento en el consumo celular total de energía (aeróbico más anaeróbico), que se relaciona con la actividad contráctil originada por el frío.

Tras los diferentes periodos de isquemia se han observado diversos grados de **EDEMA**, apreciables desde el término de la isquemia y más visibles a las 24 horas, como describen otros autores (209,212). Con tiempos de isquemia de 3 horas, se recuperan los valores basales a la semana al perfundir con suero a 10°C y 20°C, que difiere de lo apreciado por Swartz (212), persistiendo el edema al utilizar suero a 4°C. Con periodos de isquemia de 4 y 5 horas el edema persiste a la semana, siendo menos intenso con perfusión a 10°C en los tres tiempos, seguido de la perfusión con suero a 20°C para 4 horas de isquemia y de la perfusión con suero a 4°C para las 5 horas de isquemia.

Mediante el análisis de sangre se han obtenido los diferentes **pH** en los distintos tiempos. En todos ellos, se ha comprobado una disminución del mismo al finalizar el tiempo de isquemia y una leve recuperación a los 30 minutos de revascularizar, siendo más manifiesto con periodos de isquemia de 4 y 5 horas. A la semana del experimento, sólo las extremidades perfundidas con suero a 10°C, hipotermia intermedia, presentan un pH semejante al basal. Con suero a 20°C se recupera el pH pero sin llegar a su cifra basal, siendo más manifiesto con perfusión a 4°C, en donde la recuperación del pH queda muy por debajo del basal, **Fig.23 y 24**.

Los valores obtenidos en este experimento no están en relación con los obtenidos por Swartz (212), cuyos descensos del pH en los mismos tiempos de isquemia son muy superiores con temperatura ambiente (22°C). El pH muscular descendió desde el nivel control de 7,43 hasta 6,76 \pm 0,06 a las 3 horas de isquemia y a 6,12 \pm 0,14 a las 6 horas (212). Tampoco están de acuerdo con los resultados aportados en sus estudios por Sapega (184), en lo referente a las temperaturas de enfriamiento de 1°C y 22°C. Con ellas, a pesar de un descenso del pH casi idéntico, los músculos que se enfriaron a 1°C

mostraban una acidosis total menor que los músculos conservados a 22°C. En los resultados obtenidos en este experimento, al final de los tiempos de isquemia de 3 y 4 horas hay una mayor acidosis con suero a 20°C, siendo mayor con suero a 4°C si la isquemia es de 5 horas. A la semana, la recuperación es mejor al utilizar suero a 20°C que a 4°C. Si se está de acuerdo en que la menor acidosis total se produce con temperaturas mantenidas entre 10°C y 15°C, según Sapega (184). Tampoco se correlacionan con los resultados obtenidos por Chiu (43) en isquemias con torniquete de 3 horas en perros, con su descenso del pH más intenso y una recuperación más rápida en 15 minutos.

En estudios básicos de fisiología celular (47,49) se ha mencionado la alcalinización inicial, durante la primera hora, que se produce al enfriar un tejido, hecho no apreciado en este estudio al realizar las mediciones al finalizar los tiempos de isquemia. Es muy probable que las poblaciones de fibras musculares, tanto rojas como blancas, se benefician mucho de esta alcalinización inicial celular, ya que ésta disminuye de manera drástica la severidad de la acidosis posterior de cada célula (65,183,184).

Los resultados obtenidos del estudio de la **GLUCOSA** ponen de manifiesto un descenso importante durante el tiempo en que la extremidad permanece en isquemia, menos acusado y con mejor recuperación utilizando la técnica de la hipotermia intermedia que con la perfusión de suero a 20°C y 4°C, ambos con un comportamiento similar, **Fig.40 y 41**.

Los valores de **UREA** están descendidos al finalizar los periodos de isquemia y se elevan al revascularizar la extremidad, estando próximos a los valores basales con suero a 4°C y 10°C, con leve ascenso al utilizar suero a 20°C. A la semana, la urea presenta valores basales si utilizamos la técnica de la hipotermia intermedia, pero está más elevada al perfundir con suero a 4°C y la mayor elevación se produce con suero a 20°C, **Fig.48 y 49**.

Al observar el comportamiento del **CALCIO** vemos un descenso importante al finalizar los tiempos de isquemia, más intenso al perfundir con suero a 4°C y menor con la hipotermia intermedia; el menor descenso se produce con suero a 20°C. Al revascularizar, las cifras menores se aprecian con la técnica de la hipotermia intermedia, siendo más elevadas y parecidas con suero a 20°C y 4°C, repitiéndose estas proporciones a la semana (cifras próximas a las basales), **Fig.56 y 57**.

El **POTASIO** presenta un comportamiento similar al calcio y a la urea. Se produce un descenso de sus valores al finalizar los periodos de isquemia, muy intenso con suero a 4°C y manifiesto con 20°C. A los

30 minutos de revascularizar hay una elevación importante del potasio, con cifras próximas a las basales con suero a 4°C y mediante la hipotermia intermedia y un ascenso de sus valores al utilizar suero a 20°C. A la semana, todos los valores son superiores a los basales, con mayor grado de elevación para el suero a 20°C y menores aumentos para el suero a 4°C y mediante la hipotermia intermedia, **Fig.64 y 65**.

En los valores obtenidos de la GOT, LDH y CPK observamos un comportamiento distinto a los valores anteriores. La GOT presenta un aumento de sus cifras al finalizar los periodos de isquemia, menos intenso con la hipotermia intermedia, seguido de la utilización del suero a 4°C y los valores más altos se observan al perfundir con suero a 20°C. Al revascularizar, se producen las mayores elevaciones, siendo más intensas cuanto mayor haya sido el tiempo de isquemia. Con la técnica de la hipotermia intermedia se producen menores ascensos, siendo más intensos con suero a 4°C y los más importantes se observan con suero a 20°C. A la semana, la técnica de la hipotermia intermedia tiene unos valores similares a los basales, el enfriamiento con suero a 4°C presenta menores valores que los basales y la perfusión con suero a 20°C produce cifras superiores a las basales, con valores totales. Con respecto a los tiempos de isquemia, con suero a 4°C en la isquemia de 3 y 4 horas presenta valores por debajo de los basales, siendo superiores con isquemia de 5 horas; con suero a 20°C es a la inversa. La hipotermia intermedia mantiene sus valores próximos a los basales, **Fig.72 y 73**.

La LDH presenta un aumento de sus valores al finalizar los tiempos de isquemia, más manifiesto al utilizar suero a 20°C, menor para el suero a 4°C y cifras cercanas a las basales mediante la hipotermia intermedia. Al revascularizar ascienden todos los valores, siendo las mayores elevaciones para la perfusión con suero a 20°C y 4°C y menor para la hipotermia intermedia. A la semana, la perfusión con suero a 20°C presenta cifras superiores a las basales, siendo cifras inferiores a las basales al utilizar suero a 4°C y la hipotermia intermedia, con valores totales. Por tiempos de isquemia, con suero a 4°C y 3 horas de isquemia se aprecia un descenso de sus valores, con aumentos a las 4 y 5 horas de isquemia; con suero a 20°C aumenta en todos los tiempos de isquemia; la técnica de la hipotermia intermedia presenta aumentos de sus valores cercanos a los basales con isquemias de 3 y 4 horas, elevándose con isquemias de 5 horas, **Fig.80 y 81**.

La CPK manifiesta una clara elevación de sus cifras al finalizar los tiempos de isquemia, más intensa cuanto mayor sea el tiempo de isquemia y con suero a 20°C, seguido del suero a 4°C. Al revascularizar,

las cifras más elevadas se obtienen con el suero a 4°C, seguido del suero a 20°C y menor con la hipotermia intermedia. A la semana, todas las cifras son inferiores a las basales, con mayor descenso para la perfusión con suero a 20°C, seguido del suero a 4°C y valores no tan descendidos con la técnica de la hipotermia intermedia, utilizando valores totales. Por tiempos de isquemia, el suero a 4°C y periodos de isquemia de 3 y 4 horas presenta cifras menores que el suero a 20°C, invirtiéndose con isquemias de 5 horas. A la semana, el suero a 4°C presenta cifras menores a las basales con los tres tiempos de isquemia; el suero a 20°C presenta cifras superiores a las basales en isquemias de 3 horas, iguales con isquemia de 4 horas y muy inferiores con isquemia de 5 horas. La hipotermia intermedia presenta siempre los valores mejores con respecto a los basales, **Fig.88 y 89**.

Los valores serológicos obtenidos en este estudio están de acuerdo con lo descrito por Swartz (212) y con su afirmación que la pérdida intensa de potasio muscular puede estar ligada al deterioro del transporte activo en la membrana celular, un mecanismo que requiere la fosforilación oxidativa, pero no se está de acuerdo en su tiempo de 4 a 6 horas de isquemia caliente como tiempo máximo de reimplante, pues con perfusión a 20°C (temperatura ambiente) los valores de K⁺, GOT, LDH y CPK con 5 horas de isquemia estaban muy alterados, con un pronóstico metabólico-funcional bajo para la extremidad. También, están en relación por lo descrito por Chiu (43) al comprobar incrementos, en la vena femoral, de la CPK en isquemias de 3 horas con torniquete.

Los valores de las enzimas CPK, GOT y LDH son indicadores del grado de lesión muscular. Se sabe que estas enzimas están concentradas en el tejido muscular. Cuando se lesiona el músculo estas enzimas se escapan hacia la sangre venosa en proporción con la extensión del daño de las células musculares (149). El paso de estas enzimas a la sangre es mayor cuanto más se prolongue el tiempo de isquemia en un miembro amputado, y más a temperatura ambiente que si se conservan en frío (149).

Presta (167), en 1981, ha indicado que los datos obtenidos con el análisis de los enzimas séricos no son útiles cuando se estudian aislados y distanciados del episodio isquémico inicial, y que sí lo son cuando se les relaciona con los descubrimientos histológicos y ultraestructurales.

Rubin (179), en 1992, comprueba elevaciones de la CPK según es mayor el tiempo de isquemia. Los valores obtenidos se relacionan con el daño muscular producido entre 1 y 4 horas de isquemia.

Ihnken (100), en 1996, en experimentos llevados a cabo para controlar el daño producido por la

revascularización y perfusión de sustancias, tras 6 horas de isquemia, apreció aumentos de la CPK, LDH y K^+ como exponentes de lesión muscular, con descensos del pH, ATP y Glucosa, siendo confirmado por otros autores (143). Con un mejor control de la reperfusión disminuyen las lesiones, apreciando un mayor consumo de oxígeno y glucosa, con descenso del K^+ y del edema de la extremidad y aumento del pH y del ATP (100).

El estudio experimental del síndrome compartimental ha demostrado que la lesión muscular, medida por los valores elevados de CPK y LDH total, sucede muy al principio del síndrome compartimental tibial anterior. Los valores absolutos de estas enzimas, sin embargo, no están relacionados con la cantidad de presión introducida pues, en ocasiones, tras realizar una fasciotomía, estos valores no regresan a su valor normal sino que se elevan. Esta observación puede explicarse por el acúmulo de sangre existente dentro del compartimento, a nivel de la microcirculación, y que es reabsorbida en dicho momento. Si la fasciotomía se realiza en las primeras 12 horas el músculo puede ser funcional (85,148,176), lo que sugiere que los cambios irreversibles en la microcirculación no ocurren, lo más probable, hasta después de 12 horas de haberse iniciado un síndrome compartimental (134,135).

Este ha sido uno de los motivos por el cual no se ha utilizado, en este estudio, el aumento de presión intracompartimental ya que, además, queda muy limitado a una zona de la extremidad y produce una serie de fenómenos (mayor afectación del nervio) que no imitan una amputación total o parcial de una extremidad. Los resultados de 12 horas son ciertos para ese experimento, que dista mucho de las 4 y 5 horas que se han estudiado en este trabajo experimental.

Las complicaciones metabólicas dependientes de la isquemia arterial aguda (25,225,229) y de la necrosis tisular secundaria a ésta han sido estudiadas de manera exhaustiva en los últimos años dentro del llamado síndrome de revascularización. Durante la fase isquémica aparece acidosis metabólica, azotemia e hiperpotasemia, que si no se corrigen rápido pueden ocasionar la muerte del paciente. La acidosis metabólica es variable y depende de la glucólisis anaerobia, con producción de ácido láctico y pirúvico por la anoxia tisular; estos metabolitos descenden el pH y la concentración de bicarbonato. La revascularización afecta de manera principal al metabolismo del potasio y se produce una hiperpotasemia dependiente de la citolisis. Esta alteración es un factor pronóstico que puede ocasionar el fallecimiento del paciente en la revascularización (25,195), por elevación brusca de la tasa de potasio en sangre. Los

cambios enzimáticos afectan de manera especial a la CPK, LDH, GOT y GPT, lo que se traduce en esencia en el daño del músculo estriado. Cuando la isquemia avanza, los grupos musculares se edematizan e induran de forma progresiva. Este daño muscular también puede evidenciarse por la aparición de mioglobinuria (192,195), además de un descenso de la diuresis. El fracaso renal agudo depende del grado de isquemia del músculo, la acidosis y la mioglobinuria (192). En los casos leves, la alteración renal es transitoria y reversible, mientras que en los casos con complicaciones metabólicas severas la mioglobinuria y la acidosis persistente pueden conducir a un fallo renal irreversible. La mortalidad asociada a las complicaciones metabólicas de la isquemia arterial aguda de las extremidades está, de manera aproximada, entre un 30% a 80% de los casos, mientras que la tasa de amputación de la extremidad es del 30% al 50% (195).

Se han descrito diferentes cambios histológicos en los músculos isquémicos utilizando **microscopía óptica y electrónica** en el experimento realizado. Con microscopio óptico e histoquímica se aprecia que la rotura de células musculares, depósitos cálcicos, grasa en las fibras lesionadas y en los macrófagos, la desorganización intermiofibrilar, vacuolas celulares y un infiltrado inflamatorio generalizados sirven como una clara indicación de fibras inviables. Con el microscopio electrónico los cambios isquémicos encontrados han sido ensanchamiento de los espacios interfibrilares, fibras musculares con desorganización de la estructura fibrilar, vacuolas y rotas, anormalidades mitocondriales (como hinchazón y/o rotura mitocondrial y desorganización de las crestas, con cuerpos densos), presencia de fibroblastos, hinchazón del retículo sarcoplásmico, pérdida de los gránulos de glucógeno, sarcómeras no alineadas, aumento de las gotitas de lípidos, lesiones vasculares, como destrucción parcial de la pared, vesículas de pinocitosis y aumento del espacio perinuclear, y nervios intramusculares con alteraciones de la vaina de mielina, siendo indicativos de lesión muscular irreversible al ser generalizadas.

La desorganización de la vaina de mielina, zonas de roturas y picnosis nuclear, junto con la vacuolización de las células de Schwann, se aprecian en los nervios femorales e indican lesión irreversible.

Estas lesiones constituyen manifestaciones morfológicas de células musculares muertas y nervios irrecuperables. El número de fibras con dicha degeneración encontradas tras una isquemia, con supervivencia del músculo de uno o más días, están relacionadas con el fracaso en la recuperación de la

contractilidad.

Con perfusión mediante la técnica de la hipotermia intermedia estos hallazgos se producen a las 5 horas y no en todas las fibras musculares, con zonas de regeneración focal (infarto en evolución); utilizando perfusión con suero a 4°C y 20°C estas lesiones son focales y aisladas a las 4 horas de isquemia, presentando fibroblastos aislados con el suero a 4°C, siendo las lesiones más importantes y extensas con isquemias de 5 horas en ambos, con fibroblastos más frecuentes. Con tiempos de isquemia de 3 horas las lesiones son focales y reversibles con los tres métodos de perfusión, **Fig.90 a 123**.

A nivel del nervio femoral, las lesiones más graves se producen con perfusión a 4°C a partir de las 4 horas de isquemia, siendo lesiones irreversibles con 5 horas en perfusión con suero a 4°C y 20°C. La perfusión con suero a 10°C, hipotermia intermedia, produce lesiones menos graves y reversibles, incluso, a las 5 horas de isquemia, **Fig.124 a 129**.

Muramatsu (149), en 1985, encuentra, con microscopio óptico, tanto en músculos conservados en frío como a temperatura ambiente, edema intrafibrilar, hinchazón de las fibras, núcleo picnótico, hialinización de las fibras musculares y su separación del endomisio, con menor afectación para la conservación en frío. Si la isquemia era de 6 horas, al revascularizar el músculo regresaba a la normalidad en la extremidad conservada en frío. Si eran 12 horas de isquemia, se apreciaban hinchazón y destrucción de capilares y roturas fibrilares, indicando una lesión irreversible. Con microscopio electrónico (149) aprecia edema miofibrilar, vesículas intracelulares, cromatina nuclear dispersa, separación de los filamentos en la fibrilla, ensanchamiento de los espacios interfibrilares, hinchazón y destrucción del retículo sarcoplásmico y ausencia de gránulos de glucógeno, mitocondrias hinchadas, con pérdida de la matriz densa, desorganización de las crestas y la presencia de cuerpos densos intramitocondriales, alcanzando su máximo diámetro a las 6 horas de isquemia y sin diferencias según el método de conservación.

El examen de secciones de tejido muscular con microscopio óptico y electrónico revelan una correlación entre el escape de las enzimas y la extensión del daño de la célula muscular en el músculo isquémico. El hinchazón celular (edema) y la separación del endomisio de las células musculares han sido los cambios característicos de isquemia aguda observados al microscopio óptico en preparaciones de músculos isquémicos teñidas con hematoxilina-eosina (149). Al microscopio electrónico la presencia

de ensanchamientos de los espacios entre las miofibrillas, la disminución del número de gránulos de glucógeno y las anomalías mitocondriales, como hinchazón y aparición de cuerpos densos intramitocondriales, se relacionan con los aumentos de las enzimas musculares en sangre venosa (149). Además, las alteraciones mitocondriales están ligadas a una reducción del pH, sugiriendo que la hinchazón mitocondrial y la presencia de cuerpos densos intramitocondriales son los cambios irreversibles más precoces y más definitivos observados en las células isquémicas (149).

Un descenso marcado de los gránulos de glucógeno en los espacios intermiofibrilares causa un acúmulo de ácido láctico, producido por un metabolismo anaerobio durante la isquemia. En un medio ácido la mitocondria dañada primero libera GOT y cuando la célula comienza a degenerar libera, entonces, CPK, LDH y otras sustancias. Los cambios mitocondriales pueden ser reversibles en un 100% si se padece una isquemia inferior a 18 minutos; se recupera un 50% después de 40 minutos, pero después de 60 minutos el daño es irreversible (149).

Nuestros hallazgos no están de acuerdo con lo encontrado en los experimentos de Muramatsu (149), en lo referente a los distintos tipos de perfusión, y sí se correlacionan con el tiempo de isquemia y las alteraciones serológicas relacionadas.

Van Alphen (220), en 1988, diseñó una clasificación con el microscopio óptico basada en los descubrimientos histológicos del tejido muscular reimplantado, después de conservación en frío. En su estudio, la necrosis focal y la proliferación reactiva de fibroblastos son parámetros de lesión muscular isquémica. La degeneración discoide no fue vista en todos los grupos experimentales, pero la necrosis focal, la degeneración hialina y los procesos de regeneración han sido las manifestaciones más características en los músculos reimplantados después de una isquemia fría de 12 horas.

En el proceso de regeneración, los brotes de células musculares, que se parecen a células gigantes multinucleadas, se pueden encontrar en alguna parte del músculo. El núcleo de la célula muscular está hinchado, vesiculado, contiene abundante cromatina heteromórfica y un nucleolo prominente, ha emigrado hacia el centro de la célula y aparece basofilia citoplasmática (111,220).

Los hallazgos en este trabajo se han presentado a partir de las 4 y 5 horas de isquemia; incluso, con 3 horas de isquemia hay pequeñas alteraciones miofibrilares reversibles con sueros a 4°C y 20°C, pero no hay lesiones con suero a 10°C. El tiempo de 12 horas en isquemia fría ha sido descrito en ratas y debería

presentar lesiones más importantes.

Labbe (120), en 1988, describe un 30% de necrosis muscular después de mantenerlo en isquemia durante 4 horas. Al microscopio electrónico presenta hinchazón de las mitocondrias, depósitos de calcio y roturas fibrilares.

Messina (138), en 1990, con microscopio óptico, comprueba en ratones lesiones vasculares diferentes según los tiempos de isquemia. Con 3 horas hay obstrucciones capilares difusas, sin lesiones de arterias o venas. Con 4 ½ horas se producen áreas de "no reflujo", por lesiones de arterias y venas.

Pedowitz, en 1991 (161,162) y en 1992 (163), utilizando torniquetes con presiones de 350 mmHg para isquemizar durante 2 horas las extremidades comprobó, con microscopía, que las zonas de necrosis musculares estaban situadas en el centro de los músculos, afectando menos a la periferia.

El no utilizar en este trabajo la técnica del torniquete se debe a esa afirmación, ya que el torniquete produce lesiones focales más intensas (zona de colocación del torniquete, con afectación del nervio por compresión) y lesiones generales diversas (menos intensas).

Hickey (92), en 1992, comprueba que con 3 ½ horas de isquemia sobreviven un 40% de los músculos estudiados, a las 4 horas sólo un 10,7% y a partir de las 6 horas no sobreviven. Los músculos más dañados han sido los más próximos a la oclusión vascular.

Skjeldal (198), en 1992, utilizando el microscopio óptico, en experimentos de 4 ½ horas de isquemia con distintas temperaturas, apreció que a 34°C siempre se producía la necrosis muscular; si la temperatura era superior a 27°C la necrosis era casi total; con temperaturas de 24°C había un 80% de necrosis; a 22°C había sólo un 29% de necrosis.

Sternbergh (207), en 1992, no apreció lesiones musculares con microscopio electrónico en isquemias de 1 hora pero sí en isquemias de 2 y 3 horas, con vacuolización del endotelio de los vasos, edema intracelular y disminución de la luz vascular. Las miofibrillas presentaban edema intersticial, hinchazón de las mitocondrias y distorsión de la estructura en bandas.

Petrasek (164), en 1994, describe una mayor afectación de las fibras musculares de contracción rápida cuando los tiempos de isquemia son superiores a 5 horas. Si los animales son mantenidos en isquemia a temperatura ambiente, se afectaban más los grupos musculares proximales que los distales. Y si la isquemia era a temperatura corporal, la necrosis muscular era uniforme, tanto con microscopio óptico

como con el electrónico (26,164,206).

Strock y Majno (209) estudiaron el cese de la circulación en el músculo de patas de ratas, realizando isquemias con torniquete durante 2 ½ horas. La microscopía electrónica del tejido muscular y del endotelio capilar mostró que la lesión isquémica era de naturaleza focal y no se relacionaba con áreas con flujo y sin él. El endotelio capilar mostró diversas lesiones, desde la balonización o hinchazón mitocondrial hasta la destrucción parcial o la rotura total de la pared endotelial. Sus resultados sugieren que 2 ½ horas de isquemia ocasionan el suficiente daño capilar como para alterar la circulación en el tejido muscular. Esta lesión parece reversible cuando la circulación a nivel capilar se restablece en un periodo de 2 a 3 horas. Periodos superiores a 3 horas originan cambios irreversibles en el endotelio capilar, los cuales bloquean la perfusión del músculo. Con 6 ó más horas de isquemia no es posible afirmar si es el músculo el que ha sufrido la lesión irreversible o ha sido el endotelio capilar (209).

El músculo es muy propenso a sufrir daño, como se demuestra mediante estudios morfológicos y bioquímicos, cuando se induce isquemia, considerándose a la hipotermia como beneficiosa para el mantenimiento de la viabilidad muscular y la disminución de la toxemia del reimplante. Después de 5 a 6 horas de isquemia hipotérmica se han visto intensos cambios reactivos, como la proliferación de fibroblastos interfibrilares, que se incrementan con el tiempo de isquemia (111,212). Además, la hinchazón mitocondrial y la necrosis focal de las células musculares, así como también la hinchazón de las células endoteliales capilares, se ven tan pronto como a las 2 horas de cesar el flujo sanguíneo (212). Estos cambios morfológicos reflejan una lesión hipóxica de la actividad metabólica de los tejidos, pues la producción obligada de fosfatos de alta energía está subordinada al metabolismo oxidativo y es imprescindible para el transporte activo en las membranas celulares y para las proteínas contráctiles del músculo esquelético (212).

De las observaciones antedichas es evidente que los sistemas enzimáticos implicados en la fosforilación oxidativa son sensibles a la lesión isquémica y pueden ser el determinante de la muerte celular. Estos sistemas están presentes en las mitocondrias del tejido muscular y en otros tejidos, y el transporte activo a través de la membrana celular depende de ellos (50,51). La supervivencia del músculo a la isquemia de 3 horas y no a la de 6 horas se explica por un fracaso de los sistemas enzimáticos (212).

Basados en investigaciones realizadas en el presente estudio, se ha observado que el máximo tiempo de isquemia en hipotermia que garantiza la funcionalidad del miembro reimplantado, o de tejidos trasplantados que contengan músculo, puede ser prolongado hasta las 5 horas, mediante conservación hipotérmica con suero fisiológico utilizando la técnica de la hipotermia intermedia, con suero a 10°C, y que las diferencias en la viabilidad de los músculos conservados en isquemia, entre cambios reversibles e irreversibles, pueden ser demostrables de manera cuantitativa mediante el análisis del ATP y otros fosfatos de alta energía mediante la técnica de HPLC y con su representación gráfica equiparable, la RNM.

Utilizando la **HPLC**, si tomamos los valores de AMP en conjunto, podemos ver como con la técnica de la hipotermia intermedia los valores obtenidos a la semana de la isquemia, con respecto a las cifras al finalizar el periodo de isquemia, se superponen o son similares; disminuyen dichos valores a la semana si se utiliza suero a 4°C y están aumentados si se perfunde con suero a 20°C, **Fig.142**. Si apreciamos el ADP, mediante la técnica de la hipotermia intermedia hay una disminución importante de sus cifras a la semana de la isquemia, en relación a los valores al finalizar los periodos de isquemia, lo mismo que al utilizar suero a 20°C, pero con un descenso menor en sus valores; al utilizar suero a 4°C se aprecia una elevación de sus cifras en ese mismo periodo, **Fig.146**. Si observamos los valores de ATP en conjunto comprobamos como con la técnica de la hipotermia intermedia se producen los mayores ascensos al cabo de una semana, menor aumento al perfundir con suero a 20°C y la menor elevación es al utilizar suero a 4°C, **Fig.150**.

Los resultados gráficos de la **RNM** son equiparables a los obtenidos mediante HPLC. En isquemias de 3 horas se aprecia deplección del ATP y PCr, con aumentos de Pi y PME y PDE, recuperando los niveles de ATP a la semana de la isquemia, más manifiesto con suero a 10°C y 20°C, y menos con suero a 4°C. A las 4 horas de isquemia se produce un descenso de ATP y PCr, con aumentos de Pi y mayor aumento de PME y PDE, siendo más visible al utilizar suero a 4°C y 20°C. La recuperación del ATP a la semana de la isquemia se produce en los tres grupos, siendo mínima y con persistencia de los PME y PDE con suero a 20°C, recuperación mayor con suero a 4°C y persistencia de los PME y PDE; máxima recuperación con la técnica de la hipotermia intermedia. Con 5 horas de isquemia se produce la pérdida de los fosfatos ricos en energía y una menor recuperación de los mismos a la semana. Con suero a 4°C no

hay señal valorable de ATP y aumentos de Pi, PME y PDE; con suero a 20°C hay alguna señal de ATP y aumentos de Pi, PME y PDE; con la hipotermia intermedia se aprecia señal de ATP, pérdida de PCr y aumentos de Pi, PME y PDE. A la semana, utilizando el suero a 20°C no se aprecian picos valorables de ATP y PCr, con persistencia de Pi y gran cantidad de PME y PDE; con suero a 4°C aparece señal clara de ATP, PCr y persistencia de Pi, PME y PDE; con la hipotermia intermedia hay claras señales de ATP y PCr, persistencia del Pi y menor cantidad de PME y PDE, **Fig.151 a 170.**

Swartz (212), en 1978, en estudios del músculo vasto lateral de la pata de una rata, dejando intacto el nervio ciático para eliminar el efecto de la denervación sobre el metabolismo de los fosfatos ricos en energía del músculo, analizados mediante cromatografía con líquido a alta presión de Brown (19), ha obtenido los valores de AMP, ADP y ATP para comprobar el funcionamiento posterior de la extremidad en el periodo de recuperación. Respecto a los valores de ATP de las patas amputadas y mantenidas en isquemia durante 5 horas, conservadas a temperatura ambiente (22°C), en un baño helado (1°C) y refrigeradas (4°C), observó que el músculo mantenido a temperatura ambiente contenía el 5% del ATP, mientras que los otros dos métodos de conservación tenían el 14% de ATP. Esto se explica por el efecto protector del frío sobre el músculo isquémico. En estos experimentos (212) se aprecian unos niveles de ATP normales durante la primera hora de isquemia observando un descenso rápido en la segunda. Esta veloz caída no se evitó con el almacenamiento a temperaturas frías (por debajo de 4°C). A la vez, después de la primera hora, se produce un descenso lineal del pH, que corresponde al cese de la fosforilación oxidativa y el comienzo de la glucólisis anaerobia y la producción de lactato, alcanzando su punto más bajo, pH de 6,12, a las 6 horas. Con el restablecimiento de la circulación, en extremidades mantenidas en isquemia durante 3 horas, los valores de ATP y pH se recuperan en 24 horas, debido al lavado del ácido láctico y al restablecimiento de la fosforilación oxidativa por medio de reacciones enzimáticas intactas. En patas con isquemia de 6 horas a temperatura ambiente no se observó la recuperación anterior. En la isquemia normotérmica la función muscular es satisfactoria si la revascularización, y la circulación, se realizan dentro de las 3 horas post-isquemia. Y el ATP no ascenderá al 50% del valor control hasta doce días después de realizado el reimplante (212). Para otros es normal a los siete días (111).

Eisenhardt (59), en 1984, ha comunicado que los valores de ATP descienden al 50% del valor normal

después de una isquemia normotérmica de 2 horas, en un modelo experimental de reimplante con sección del nervio ciático.

Kihira (111), en 1991, comprobó mediante HPLC, en un modelo experimental en ratas con sección del nervio ciático, que los valores de ATP descendían al 63% en un grupo control no isquémico sin reimplantar, con respecto al grupo control. En el grupo de reimplantes, los valores eran similares al anterior tras una isquemia fría de 9 horas, pero descendían al 61% a las 12 horas.

Rubin (179), en 1992, mediante HPLC, en experimentos en perros con 5 horas de isquemia normotérmica y perfusión durante 1 a 48 horas, comprobó un descenso de PCr y ATP y un incremento de AMP y ADP. Tras la perfusión, se recuperaron los valores basales de PCr, AMP y ADP permaneciendo descendido el ATP, con una disminución total del contenido de los nucleótidos. En los músculos con necrosis mínima, la PCr ascendió a los niveles basales, el AMP y ADP se normalizaron y el ATP se incrementó después de 1 hora de perfusión, estando en niveles pre-isquémicos a las 2 horas. En músculos con necrosis moderada, la PCr se recuperó después de 1 hora pero el ATP descendió, elevándose a las 48 horas sin llegar a cifras basales. En músculos muy necróticos, el descenso del ATP fue muy superior que en los otros grupos, no recuperándose después de la perfusión. El ADP descendió al perfundir. El AMP disminuyó durante la isquemia, se normalizó a la hora de perfundir y se elevó durante 48 horas más. La PCr aumentó después de 1 hora de perfusión, conservando niveles del final de la isquemia durante 48 horas.

Skejldal (198), en 1992, describió un descenso del ATP tras 4 1/2 horas de isquemia. El descenso del ATP era similar a temperatura ambiente (21,7°C) como con congelación (1,2°C), con un aumento inicial del pH en el músculo en hipotermia, lo que sugiere que el efecto protector de la hipotermia no es por descenso del metabolismo sino por la alcalinización inicial que se produce en las células isquémicas, que mitigará la acidosis posterior.

Ihnken (100), en 1996, demostró descensos del ATP después de 6 horas de isquemia. Con perfusión sin control el descenso del ATP fue muy superior (por alteración del metabolismo respiratorio y reducción del metabolismo de la glucosa).

Estudios de Hoult (99), utilizando técnicas de RNM en músculos intactos de ratas, han mostrado que después de una amputación los niveles de PCr descienden de una manera lineal, hasta unos valores

insignificantes, en una hora y media. No ha desaparecido aún la PCr cuando los niveles de ATP empiezan a descender, desapareciendo la mitad a las 3 horas. Y el pH muscular cae hasta 6,2 en el mismo periodo de tiempo, acelerando su descenso después que el contenido de PCr es casi cero, a la hora y media, relacionándose con el comienzo del metabolismo anaerobio y la producción de lactato.

Osterman et al (155), en 1984, estudiaron la tolerancia del músculo esquelético a la isquemia, analizando los niveles de los fosfatos de alta energía utilizando la espectroscopia del P-31 con R.N.M. Reconocen que los niveles de ATP son unos parámetros seguros en la identificación del grado de lesión muscular debido a la isquemia. A mayor grado de lesión muscular, mayor pérdida de ATP y mayor dificultad para recuperarlo.

Las reacciones básicas de la isquemia y de la hipoxia en el músculo esquelético activo, bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas, descritas por Radda (168) y Taylor (214), ponen de manifiesto un descenso de la PCr de un 50% después de 5 minutos de isquemia, en un músculo contraído, con incrementos del Pi y sin alteraciones en las concentraciones del ATP durante mucho tiempo.

Los niveles de ATP de los tejidos se mantienen a expensas de la PCr, hasta que se consume en su totalidad. La isquemia finaliza con el descenso de la concentración de ATP y una acidosis a medida que comienza la glucólisis anaerobia (212). En el miocardio canino la caída acelerada del ATP se nota tras 1 hora de isquemia normotérmica (107,212). Tras la reperusión, a los 30 minutos los valores de PCr son normales, pero las cifras del ATP están por debajo del 50%, observándose un descenso simultáneo en el consumo de oxígeno y en la contractilidad miocárdica, originados por las alteraciones metabólicas que incapacitan al músculo cardíaco para utilizar el oxígeno disponible.

Eckert (55), en 1991, estudió muestras del músculo pectoral en humanos y del latissimus dorsi en perros y observó que el ATP siempre desciende su concentración después de desaparecer la PCr. En humanos, con isquemia de 135 minutos y temperatura de 34°C el ATP podía recuperarse al revascularizar el músculo; con 205 minutos no se recuperaba y el músculo quedaba dañado de manera irreversible. Al comparar con la PCr, comprobó como con una isquemia a 36°C desaparecía en 110 minutos y el ATP a los 180 minutos, aumentando hasta los 270 minutos con isquemia a 26°C y el ATP hasta los 360 minutos. Concluye que el periodo de isquemia que puede considerarse como crítico en músculos esqueléticos del hombre está en las 2,25 horas a 34°C y en 5 horas con temperaturas inferiores a 26°C.

Los estudios de Wolff (232), en 1993, demuestran que los músculos esqueléticos de injertos, en solución salina a temperatura ambiente, pueden ser viables con 3 horas de isquemia. Entre 3 y 4 horas de isquemia los considerables daños en el metabolismo energético sólo son recuperables después de 12 horas. Con más de 4 horas de isquemia hay una completa pérdida de las reservas energéticas, con unas señales más débiles de ATP. La acumulación de glucofosfatos y el incremento de la acidez señalan la progresiva glucolisis anaeróbica, y un valor de pH de 6 parece ser crucial para la supervivencia del injerto, ya que con 6 ó menos de pH las lesiones son irreversibles.

El estudio de la **respuesta neuromuscular** con el Tof-Guard ha demostrado que los tiempos de 3 horas presentan mejor recuperación que tiempos de 4 y 5 horas, que presenta la menor respuesta. Con la técnica de la hipotermia intermedia se consigue la mejor recuperación al cabo de una semana de la isquemia, con menor recuperación con suero a 4°C y la mínima se obtiene con suero a 20°C, **Fig.171 a 219**.

Enlentecimientos de la velocidad de conducción nerviosa y disminución de la amplitud del potencial de acción, como resultado de la isquemia, compresiones, etc., han sido descritos por diversos autores (30,130,134). El descenso de la amplitud del potencial de acción se atribuye, por la mayoría, a la disminución del número de unidades motoras funcionantes (se sabe que la unión neuromuscular, no el nervio en sí mismo, es el segmento de la unidad motora más sensible a la hipoxia, por alteraciones de los vasos más pequeños) (6,37,130). Mediante estudios del nervio con microangiografía, tras 8 horas de isquemia, se descubrió que la pared endotelial se volvía porosa y que las células endoteliales de los vasos del nervio permitían escapes dentro de la sustancia axonal. El resultado es una axontmesis o interrupción en la continuidad del nervio, que era reversible (130). El mecanismo de la reducción de la velocidad de conducción del nervio es menos claro. Algunos investigadores sostienen que las fibras de conducción más rápida son más sensibles a la isquemia, otros afirman que son las fibras de conducción más lenta, más pequeñas y no mielinizadas (37,163) y para otros la isquemia produce una reducción de la velocidad de conducción de todas las fibras nerviosas (130,134). Además de los efectos directos de la isquemia, otras explicaciones posibles para la disminución de la velocidad de conducción nerviosa observada incluyen efectos de la temperatura, tóxicos, la presión y la acidosis (134,231).

En algunos experimentos, se ha comprobado como la capacidad del músculo para contraerse, con

posterioridad a una estimulación eléctrica, disminuye después de 3 horas de isquemia normotérmica y desaparece tras las 6 horas (212).

Lieber (127), en 1990, apreció una reducción del 70% de la fuerza muscular, a las 48 horas, después de 2 horas de isquemia con torniquete en cirugía de la rodilla.

Pedowitz (163), en 1992, en isquemias de 2 horas, observó que con presiones de 350 mmHg la velocidad de conducción nerviosa se recuperaba a las 24 horas, pero con presiones de 1000 mmHg no se recuperaba. Y esto está relacionado con lesiones intensas de la mielina, ya que la sensibilidad de los nervios a la isquemia depende del diámetro de sus fibras.

Por investigaciones experimentales con síndromes compartimentales, se ha demostrado que los contenidos del compartimento tibial anterior de la pata del perro (circulación, función muscular y conducción nerviosa), son muy susceptibles a los cambios en la presión dentro de dicho compartimento (176), y se ha comprobado que el nervio peroneal es más sensible que el músculo esquelético a los cambios de presión dentro de un compartimento cerrado; además, la proporción en la reducción de la velocidad de conducción del nervio depende de la presión existente dentro del compartimento (85,176). En la isquemia combinada que se produce, del nervio y del músculo, el nervio degenera seguido por una atrofia y fibrosis del músculo (130,176).

La meta específica de este estudio ha sido determinar el mejor método de perfusión y el máximo tiempo de hipotermia que resistirían las extremidades amputadas, para que fueran funcionales al reimplantarlas, usando extremidades posteriores de conejos perfundidas con suero fisiológico a tres temperaturas (20°C, 10°C o hipotermia intermedia y 4°C).

Para este fin, se ha procedido a la medición de distintos parámetros bioquímicos, serológicos y los metabolitos de los fosfatos de alta energía, así como la evaluación histológica, con microscopio óptico y electrónico, que han sido apropiados e informativos, pero que aislados no nos ayudan a conocer la verdadera capacidad funcional del músculo. Por ello, la medición de la contractilidad muscular mediante estimulación eléctrica, a los 7 días del reimplante, relacionándola con los parámetros anteriores sí nos proporcionan el mejor índice funcional de una extremidad.

Y se ha comprobado que la conservación de una extremidad en isquemia durante 5 horas

perfundiéndola con suero fisiológico y utilizando la técnica de la hipotermia intermedia, es el tiempo máximo en el cual dicha extremidad podrá ser funcional al reimplantarla, siendo éste método de conservación el óptimo, habiendo quedado demostrado mediante la comparación con otros métodos de conservación de extremidades (a temperatura ambiente o por perfusión de suero frío-helado) en un mismo modelo experimental.

V.- CONCLUSIONES

5.1. CONCLUSIONES

1.- Desde un punto de vista metabólico-funcional, el método óptimo para el enfriamiento de extremidades mantenidas en isquemia es la hipotermia intermedia, perfusión con suero a 10°C. En periodos de isquemia de 3, 4 y 5 horas ha mostrado una menor alteración metabólica e histológica y un mejor índice de recuperación funcional de la extremidad, más notorio cuanto menor sea el tiempo de isquemia.

2.- El edema de la extremidad ha sido siempre menor, con una mejor recuperación del mismo, en periodos de isquemia de 3 horas, en comparación con tiempos de isquemia superiores. La perfusión con la técnica de la hipotermia intermedia, suero a 10°C, produce un menor edema y una desaparición casi total del mismo a la semana, comparándolo con los otros dos métodos de perfusión, más manifiesto con mayores tiempos de isquemia.

3.- La perfusión mediante la técnica de la hipotermia intermedia produce menores descensos del pH y una mejor recuperación del mismo, más manifiesto con menores tiempos de isquemia ($p<0,001$), que la perfusión con suero a 4°C y a 20°C.

4.- La disminución durante los periodos de isquemia de los valores de glucosa, urea, calcio y potasio y su recuperación a la semana se obtienen de manera más favorable perfundiendo con suero a 10°C ($p<0,001$) y con menores tiempos de isquemia. La perfusión con sueros a 4°C y a 20°C originan alteraciones muy parecidas, con menor recuperación de los valores con suero a 20°C.

5.- Las variaciones de los valores de la GOT, LDH y CPK están muy relacionadas con la temperatura de perfusión y el tiempo de isquemia ($p<0,001$). El enfriamiento de la extremidad con suero a 10°C, hipotermia intermedia, origina las menores alteraciones y una mejor recuperación de los valores, próximos a los basales, al cabo de la semana.

6.- La perfusión con suero a 4°C y a 20°C originan descensos importantes de los mismos, con un comportamiento inverso. Con tiempos de isquemia de 3 y 4 horas la perfusión con suero a 20°C presenta mayores alteraciones que la perfusión con suero a 4°C; con 5 horas de isquemia sus efectos son al contrario.

7.- Con el microscopio óptico, la presencia de fibras necrosadas, depósitos cálcicos, infiltrado inflamatorio y grasa en las fibras lesionadas y en los macrófagos en las diferentes técnicas de tinción, y fibras con vacuolas y/o rotas y desorganización intermiofibrilar con las técnicas histoquímicas, son indicativas de lesión irreversible del músculo si son generalizadas.

8.- En el microscopio electrónico, la presencia de fibras musculares con vacuolas, rotas y con edema intersticial, mitocondrias balonizadas y con cuerpos densos en su interior, pérdida de glucógeno y sistema reticular dilatado, pérdida de la alineación de la sarcómera, fibroblastos interfibrilares, vasos con vesículas de pinocitosis en la pared, destrucción parcial de la célula endotelial y aumento del espacio perinuclear, y nervios intramusculares con rarefacción de la mielina, son indicativos de lesión irreversible del músculo al ser generalizadas.

9.- La presencia en los nervios femorales, estudiados con microscopía electrónica, de homogenizado de la vaina de mielina, vacuolas, picnosis nuclear y zonas de rotura, son signo de lesión irreversible.

10.- Las lesiones histológicas más importantes se han producido al perfundir con suero a 4°C, menores con suero a 20°C, aunque muy parecidas, y las menores lesiones se han observado al perfundir la extremidad con suero a 10°C. Y con tiempos de isquemia de 3 horas las lesiones son mínimas o inexistentes, siendo muy graves y más generalizadas con tiempos de isquemia de 5 horas.

11.- La perfusión mediante la técnica de la hipotermia intermedia, suero a 10°C, origina menores alteraciones y mejor recuperación de los niveles de AMP ($p<0,007$), ADP ($p<0,003$) y ATP ($p<0,00003$) que la perfusión con suero a 4°C y 20°C, en estudios con HPLC.

12.- A la semana, la recuperación muscular después de perfundir con suero a 10°C es mejor en todos los tiempos de isquemia y con todas las estimulaciones ($p<0,0001$); con suero a 4°C y estimulación con 10 mA se produce la misma recuperación que con suero a 20°C, pero con el resto de estimulaciones y tiempos es mejor su porcentaje ($p<0,001$); con suero a 20°C apreciamos las peores recuperaciones ($p<0,001$).

VI.- BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Ackerman J.J.H; Grove T.H; Wong G.G; Gadian D.G; Radda G.K. Mapping of metabolites in whole animals by P-31 NMR using surface coils. *Nature London*. 283: 167-170; 1980.
- 2.- Acland R.D; Schusterman M; Godina M. The saphenous neurovascular free flap. *Plast Reconstr Surg* 67: 763; 1981.
- 3.- Allen F.M. Resistance of peripheral tissues to asphyxia at various temperatures. *Surg Gynec Obstet* 67: 746-751; 1938.
- 4.- Allen F.M. Surgical considerations of temperature in ligated limbs. *Am J Surg* 45: 459; 1939.
- 5.- Álvarez Fernández-Represa J. Reimplantación experimental de la extremidad posterior en perros. *Fundación Juan March. Serie Universitaria* 158: 1-46; 1981.
- 6.- Ashton H. The effect of increased tissue pressure on blood flow. *Clin Orthop* 113: 15-26; 1975.
- 7.- Balibrea J.C. *Tratado de Cirugía*. 12ª Edic. Vol.III: 3194-3206; 1994. Edit. Marbán.
- 8.- Bankston L.A; Guidotti G. Characterization of ATP transport into chromaffin granule ghosts. Synergy of ATP and serotonin accumulation in chromaffin granule ghosts. *J Biol Chem* 271: 17132-17138; 1996.
- 9.- Barie P.S; Mullins R.J. Experimental methods in the pathogenesis of limb ischemia. *J Surg Res* 44: 284-307; 1988.
- 10.- Barone R. *Atlas d'anatomie du lapin*. 1: 59-182; 1973. Edit.Masson & Cte.
- 11.- Bendall J.R. Consumption of oxygen by the muscles of beef animals and related species, and its effect on the colour of meat. I. Oxygen consumption in pre-rigor muscle. *J Sci Food Agricult* 23: 61-72; 1972.
- 12.- Bendall J.R. Cold-contraction and ATP-turover in the red and white musculature of the pig, postmortem. *J Sci Food Agricult* 26: 55-71; 1975.
- 13.- Bessman S.P; Geiger P.J. Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. *Science* 211: 448-452; 1981.
- 14.- Beyersdorf F. Protection of the ischemic skeletal muscle. *Thorac Cardiovasc Surg* 39: 19-28; 1991.
- 15.- Beyersdorf F; Sarai K; Mitrev Z; Eckel L; Ihnken K; Satter P. Studies of reperfusion injury in skeletal muscle: controlled limb reperfusion to reduce post-ischaemic syndrome. *Cardiovasc Surg* 1: 330-336; 1993.
- 16.- Billroth T. (Traducción, Imprenta de la Renaixensa. Barcelona). *La patología quirúrgica general y su terapéutica*. 1877.
- 17.- Bistrian B.R; Blackburn G.L; Vitale J; Cochran D; Naylor J. Prevalence of malnutrition in general medical patients. *J Am Med Ass* 235: 1567; 1976.
- 18.- Bushong S.C. *Magnetic resonance imaging: physical and biological principles*. Londres: Mosby. 1996.

- 19.- Brown P.R. The rapid separation of nucleotides in cell extracts using high pressure liquid chromatography. *J Chromatogr* 52: 257; 1970.
- 20.- Bruner J.M. Time, pressure and temperature factors in the safe use of the tourniquet. *Hand* 3: 39-42; 1970.
- 21.- Brushart TME. Preferential reinnervation of motor nerves by regenerating motor axons. *J Neurosci* 8: 1026-1031; 1988.
- 22.- Buehler M.J; Seaber A.V; Urbaniak J.R. The relationship of functional return to varying methods of nerve repair. *J Reconstr Microsurgery* 6: 61; 1990.
- 23.- Burgess E.M; Matsen F.A. Determining amputation levels in peripheral vascular disease. *J Bone Joint Surg* Vol 63-A: 1493; Dec 1981.
- 24.- Burt C.T; Cohen S.M; Barany M. Analysis of intact tissue with ³¹P-NMR. *Annu Rev Biophys Bioeng* 8: 1-25; 1979.
- 25.- Cairols M.A. Temas actuales en angiología y cirugía vascular. Espaxs S.A. Barcelona. 1993.
- 26.- Caizzo V.J; Gardner V.O; Starr K; Najarian H; Prietto C.A. Fast muscle fibers are more susceptible to ischemia. *Trans Orthop Res Soc.* 15: 145; 1990.
- 27.- Carden D.L; Smith J.K; Korthius R.J. Neutrophil mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle: role of granulocyte adherence. *Circ Res* 66: 1436-1444; 1990.
- 28.- Carrel A; Guthrie C.C. Complete amputation of the thigh with replantation. *Am J Med Sci* 131: 297-301; 1906.
- 29.- Carriquiry C; Aparecida Costa M; Vasconez L.O. An anatomic study of the septocutaneous vessels of the leg. *Plast Reconstr Surg* 76: 354; 1985.
- 30.- Caruso G; Labianca O; Ferrannini E. Effect of ischaemia on sensory potentials of normal subjects of different ages. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 36: 455; 1973.
- 31.- Cerdán S; Seeling J. NMR studies of metabolism. *Annu Rev Biophys Chem* 19: 43-67; 1990.
- 32.- Clausen T; Elbrink J; Dahl-Hansen A.B. The relationship between the transport of glucose and cations across cell membranes in isolated tissues. IX. The role of cellular calcium in the activation of the glucose transport system in rat soleus muscle. *Biochem Biophys Acta* 375: 292-308; 1975.
- 33.- Clodius L. Discussion: lymphatics drainage in patients after replantation of extremities. *Plast Reconstr Surg* Vol.79: 169; Feb. 1987.
- 34.- Cormack G.C; Lamberty B.G. The blood supply of the thigh skin. *Plast Reconstr Surg* 75: 342; 1985.
- 35.- Cornforth D.P; Pearson A.M; Merkel R.A. Relationship of mitochondria and sarcoplasmic reticulum to cold shortening. *Meat Sci* 4: 103-121; 1980.
- 36.- Costecalde M; Gaubert J; Bourse Ph; Hornus D; Fries F; Thillaye Ch; Bardier M. Arrachement subtotal d'un membre inférieur après section traumatique sur enfant de deux ans et demi. *Ann Chir* 43: 21-27; 1989.
- 37.- Chabel C; Russell L.C; Lee R. Tourniquet-induced limb ischemia: a neurophysiologic animal model. *Anesthesiology* 72: 1038-144; 1990.

- 38.- Chachaques J.C; Mitz V; de Vernejoul P., et al. Etude expérimentale de la circulation lymphatique après réimplantation de membres. *Ann Chir Plast* 28: 195; 1983.
- 39.-Chance B; Eleff S; Leigh J.S.Jr; Sokolow D; Sapega A. Mitochondrial regulation of phosphocreatine inorganic phosphate ratios in exercising human muscle: a gated 31-P NMR study. *Proc Nat Acad Sci* 78: 6714-6718; 1981.
- 40.- Chance B; Sapega A; Sokolow D; Eleff S; Leigh J.S; Graham T; Armstrong J; Warnell R. Fatigue in retrospect and prospect: 31-P NMR studies of exercise performance. In *Biochemistry of Exercise. International Series on Sports Sciences* Vol. 13: 895-906; 1982.
- 41.- Ch'en C.W; Chi'en Y.C; Paa Y.S. Savage of the forearm following complete traumatic amputation: report of a successful case. *Chin Med J* 82: 633-638; 1963.
- 42.- Chervu A; Moore W.S; Homsher E; Quinones-Baldrich W.J. Differential recovery of skeletal muscle and peripheral nerve function after ischemia and reperfusion. *J Surg Res* 47: 12-19; 1989.
- 43.- Chiu D; Wang H.H; Blumental M.R. Creatine phosphokinase release as a measure of tourniquet effect on skeletal muscle. *Arch Surg* 111: 71-74; 1976.
- 44.- Dahlbäck L.O. Effects of temporary tourniquet ischemia on striated muscle fibers and motor end-plates. Morphological and histochemical studies in the rabbit and electromyographical studies in man. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl* 7: 59-86; 1970.
- 45.- Davey C.I; Gilbert K.V. The mechanism of cold-induced shortening in beef muscle. *J Food Technol* 9: 51-58; 1974.
- 46.- Dawson M.J; Gadian D.G; Wilkie D.R. Contraction and recovery of living muscles studied by 31-P nuclear magnetic resonance. *J Physiol* 267: 703-735; 1977.
- 47.- Dawson M.J; Elliot A.C. Intracellular pH of isolated frog muscle as a function of temperature: a 31-P nuclear magnetic resonance study (abstract). *J Physiol* 360: 59; 1985.
- 48.- Dellon E.S; Dellon A.L. Functional assessment of neurologic impairment: A new approach to track analysis. *Plast Reconstr Surg* 88: 686; 1991.
- 49.- De Hemptinne A; Huguenin F. The influence of muscle respiration and glycolysis on surface and intracellular pH in fibres of the rat soleus. *J Physiol* 347: 581-592; 1984.
- 50.- De Robertis E.D.P. *Biología celular y molecular*. 11ª Edic. Músculo: 173-189; 1986. Edit. El Ateneo.
- 51.- De Robertis E.D.P. *Biología celular y molecular*. 11ª Edic. Mitochondrias y fosforilación oxidativa: 253-281; 1986. Edit. El Ateneo.
- 52.- Dickhaut S.C; DeLee J.C; Page C.P. Nutritional status: importance in predicting wound healing after amputation. *J Bone Joint Surg* 66-A: 71; 1984.
- 53.- Dransfield E; Lockyer D.K. Cold-shortening toughness in excised pork. *Meat Sci* 13: 19-32; 1985.
- 54.-Durán H. *Tratado de patología y clínica quirúrgicas*. 2ª Edic. Vol.III: 5122-5146; 1994. Edit.Interamericana-McGraw-Hill.
- 55.- Eckert P; Schnackerz K. Ischemic tolerance of human skeletal muscle. *Ann Plast Surg* 26: 77-84; 1991.

- 56.- Ege G.N (Ed). Lymphoscintigraphy. Semin Nuclear Med 13 (1) 1983. (Special issue).
- 57.- Eiken O; Nasbeth D.C; Mayer R.F; Deterling R.A. Jr. Limb replantation. I. The technique and immediate results. II. The pathophysiological effects. Arch Surg 88: 48-65; 1964.
- 58.- Eiken O; Nasbeth D.C; Mayer R.F; Deterling R.A.Jr; Apostolou K. Limb replantation. III. Long-term evaluation. Arch Surg 88: 66-77; 1964.
- 59.- Eisenhardt H.J; Isselhard W; Prangenberg G; Pichlmaier H; Klein P.J. Energy metabolism and histomorphological findings in replanted rat hindlimbs using various conservation method. Microsurgery 5: 61; 1984.
- 60.- Ernest C.B; Kaufer H. Fibulectomy-fasciotomy: An important adjunct in the management of lower extremity arterial trauma. J Trauma 11: 365-380; 1971.
- 61.-Evans P.J; Bain J.R; Mackinnon S.E; Makino A.P; Hunter D.A. Selective reinnervation: A comparison of functional recovery following microsuture and conduit nerve repair. Brain Res 599: 315; 1991.
- 62.-Fabiansson S; Reutersward A.L. Low voltage electrical stimulation and post-mortem energy metabolism in beef. Meat Sci 12: 205-223; 1985.
- 63.- Farber J.L; Chien K.R; Mitnacht S.Jr. The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. Am J Pathol 102: 271-281; 1981.
- 64.- Fawcett D.W. Tratado de histología. 12ª Edic. 297-328; 1995. Edit. Interamericana-McGraw-Hill.
- 65.- Flaherty J.T; Weisfeldt M.L; Bulkley B.H; Gardner T.J; Gott V.L; Jacobus W.E. Mechanisms of ischemic myocardial cell damage assessed by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. Circulation 65: 561-571; 1982.
- 66.- Gadian D.G; Radda G.K. NMR studies of tissue metabolism. Annu Rev Biochem 50: 69-83; 1981.
- 67.- Gili J. Introducción biofísica a la resonancia magnética aplicada al sistema músculo-esquelético. Jano Vol.54. Nº.1243: 30-36; Febrero 1998.
- 68.- Gordon L; Buncke H.J; Townsend J.J. Histological changes in skeletal muscle after temporary independent occlusion of arterial and venous supply. Plast Reconstr Surg Vol.61: 576-580; Apr.1978.
- 69.- Graham B.H; Walton R.L; Elings V.B. Surface quantification of injected fluorescein as a predictor of flap viability. Plast Reconstr Surg 71: 826; 1983.
- 70.- Graham B; Paulus D.A; Caffee H.H. Pulse oximetry for vascular monitoring in upper extremity replantation surgery. J Hand Surg 11-A: 687-692; Sept.1986.
- 71.- Granger D.N; Korthuis R.J. Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. Annu Rev Physiol 57: 311-332; 1995.
- 72.- Gregg P; Walder D. Regional distribution of circulation microspheres in the femur of the rabbit. J Bone Joint Surg 62 B: 220; 1980.
- 73.- Grinyó J.M. Reperfusion injury. Transplantation Proceedings 29: 59-62; 1997.
- 74.- Gualix J; Abal M; Pintor J; García-Carmona F; Miras-Portugal M.T. Nucleotid vesicular transporter of bovine chromaffin granules. J Biol Chem 271: 1957-1965; 1996.

- 75.- Gualix J; Abal M; Pintor J; Miras-Portugal M.T. Presence of E-adenosine tetraphosphate in chromaffin granules after transport of E-ATP. *Febs Letters* 391: 195-198; 1996.
- 76.- Gualix J; Fideu M.D; Pintor J; Rotllán P; García-Carmona F; Miras-Portugal M.T. Characterization of diadenosine polyphosphate transport into chromaffin granules from adrenal medulla. *The FASEB Journal* Vol.11: 981-990; October 1997.
- 77.- Hadju S. Behaviour of frog and rat muscle at higher temperatures. *Enzymologia* 14: 187-193; 1951.
- 78.- Haertsch P. The surgical plane in the leg. *Br J Plast Surg* 34: 464; 1981.
- 79.- Haines P; Nichter L.S; Morgan R.F; Edgerton M.T. Replantation: initial care. *Surgical Rounds* 7: 59-67; July 1984.
- 80.- Haljamäe H; Enger E. Human skeletal muscle energy metabolism during and after complete tourniquet ischemia. *Ann Surg* 182: 9-14; 1975.
- 81.- Halliwell B; Gutteridge J.M.C. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280: 1-8; 1990.
- 82.- Hamilton R; O'Brien; Morrison W. Replantation and revascularization of digits. *Surg Gynecol Obstet* 151: 508; 1980.
- 83.- Hanzlíková V; Schiaffino S. Mitochondrial changes in ischemic skeletal muscle. *J Ultrastruct Res* 60: 121-123; 1977.
- 84.- Hare G.M.T; Evans P.J; Mackinnon S.E; Best T.J; Bain J.R; Salazi J.P; Hunter D.A. Walking track analysis: a long-term assessment of peripheral nerve recovery. *Plast Reconstr Surg* 89: 251-258; 1992.
- 85.- Hargens A.R; Romine J.S; Sipe J.C; Evans K.L; Mubarak S.J; Akeson W.H. Peripheral nerve-conduction block by high muscle-compartment pressure. *J Bone Joint Surg* Vol.61: 192-200; 1979.
- 86.- Hargens A.R; Schmidt D.A; Evans K.L; Gonsalves M.R; Cologne J.B; Garfin S.R; Mubarak S.J; Hagan P.L; Akeson W.H. Quantitation of skeletal muscle necrosis in a model compartment syndrome. *J Bone Joint Surg* 63-A: 631-636; April 1981.
- 87.- Harrison D.H; Girling M; Mott G. Experience in monitoring the circulation in free flap transfers. *Plast Reconstr Surg* 68: 543; 1981.
- 88.- Heffner R.R; Barron S.A. The early effects of ischemia upon skeletal muscle mitochondria. *J Neurol Sci* 38: 295-315; 1978.
- 89.- Heppenstall R.B; Shenton D.W; Sapega A.A; Chance B; Hazelgrove J.C. Compartment syndrome: a bioenergetic study using ³¹P NMR spectroscopy. *Trans Orthop Res Soc* 9: 330; 1984.
- 90.- Heppenstall R.B; Scott R; Sapega A; Park Y.S; Chance B. A comparative study of the tolerance of skeletal muscle to ischemia. Tourniquet application compared with acute compartment syndrome. *J Bone Joint Surg* Vol.68-A: 820-828; July 1986.
- 91.-Hernández L.A; Grisham M.B; Twohig B; Arfors K.E; Harlan J.M; Granger D.N. Role of neutrophils in ischemia-reperfusion induced microvascular injury. *Am J Physiol* 253: 699-703; 1987.
- 92.- Hickey M.J; Hurley J.V; Angel M.F; O'Brien B.M. The response of the rabbit rectus femoris muscle to ischemia and reperfusion. *J Surg Res* 53: 369-377; 1992.
- 93.- Hidalgo D.A. Lower extremity avulsion injuries. *Clinics Plast Surg* Vol.13: 701; Oct.1986.

- 94.- Hill D.K. Resting tension and the form of the twitch of rat skeletal muscle at low temperature. *J Physiol* 221: 161-171; 1972.
- 95.- Höpfner E. Lleses gefassnaht, gefasstransplantationen und replanation von amputierten extremitäten. *Archiv für Klinische Chirurgie* 70: 417-471; 1903.
- 96.- Holden C.P; Padua R.A; Geiger J.D. Regulation of ryanodine receptor calcium release channels by diadenosine polyphosphates. *J Neurochem* 67: 574-580; 1996.
- 97.- Hollis D.P. Phosphorus NMR of cells, tissues and organelles. *Biol Magn Reson* 2: 1-44; 1980.
- 98.- Hori Y. Blood vessels transplantation to bone. *J Hand Surg* 4: 23; 1979.
- 99.- Hoult D.I; Busby S.J.W; Gadian D.G; Radda G.K; Richards R.E; Seeley P.J. Observation of tissue metabolites using P-31 nuclear magnetic resonance. *Nature* 252: 285-287; 1974.
- 100.- Ihnken K; Beyersdorf F; Winkelmann B.R; Mitrev Z; Unkelbach U. Experimental application of controlled limb reperfusion after incomplete ischaemia. *Br J Surg* 83: 803-809; 1996.
- 101.- Imhof B.A; Dunon D. Leukocyte migration and adhesion. *Adv Immunol* 58: 345-416; 1995.
- 102.- Irving G.A; Noakes T.D. The protective role of local hypothermia in tourniquet-induced ischaemia of muscle. *J Bone Joint Surg* 67 B(2): 297-301; 1985.
- 103.- Jacobson J; Suarez F. Microsurgery in anastomosis of small vessels. *Surg Forum* 11: 243; 1960.
- 104.- Jeacocke R.E. Calcium efflux during the cold-induced contraction of mammalian striated muscle fibres. *Biochim Biophys Acta* 682: 238-244; 1982.
- 105.- Jeacocke R.E. The kinetics of rigor onset in beef muscle fibers. *Meat Sci* 11: 237-251; 1984.
- 106.- Jeger E. Die chirurgie der blutgefäße und des herzens. Hirschwald, Berlin 1913 (Reprint: Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1973).
- 107.- Jennings R.B. Relationship of acute ischemia to functional defects and irreversibility. *Circulation* 53: 26-29; 1976.
- 108.- Jensen J.E; Jensen T.G; Smith T.K; Johnston D.A; Dudrick S.J. Nutrition in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg* 64-A: 1263; Dec. 1982.
- 109.- Jones B; Smith P; Douglas H. Replantation. *British Med J* 287: 1-2; 1983.
- 110.- Jovanovic A; Terzic A. Diadenosine tetraphosphate induced inhibition of ATP-sensitive K⁺ channels in patches excised from ventricular myocytes. *Br J Biochem* 151: 365-371; 1996.
- 111.- Kihira M; Miura T; Ishiguro N. Preservation of skeletal muscle in tissue transfers using rat hindlimbs. *Plast Reconstr Surg* 88(2): 275-84; Aug. 1991.
- 112.- Klenerman L. Tourniquet time: how long?. *Hand* 12: 231-234; 1980.
- 113.- Klenerman L. Tourniquet paralysis. *J Bone Joint Surg* 65-B(4): 374-375; 1983.
- 114.- Krarup C; Gilliatt R.W. Some effects of prolonged constriction on nerve regeneration in the rabbit. *J Neurol Sci* 68: 1-14; 1985.

- 115.- Krarup Ch; Upton J; Creager M.A. Nerve regeneration and reinnervation after limb amputation and replantation: clinical and physiological findings. *Muscle & Nerve* 13: 291-304; April 1990.
- 116.- Kubes P; Ibbotson G; Russell J; Wallace J.L; Granger D.N. Role of platelet-activating factor in ischemia-reperfusion induced leukocyte adherence. *Am J Physiol* 259: 300-305; 1990.
- 117.- Kubes P; Jutila M; Payne D. Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia-reperfusion. *J Clin Invest* 95: 2510-2519; 1995.
- 118.- Kushmerick M.J; Meyer R.A; Brown T.R. Phosphorus NMR spectroscopy of cat biceps and soleus muscles. *Adv Exper Med Biol* 159: 303-325; 1983.
- 119.- Labbe R; Lindsay T; Walker P.M. The extent and distribution of skeletal muscle necrosis after graded periods of complete ischemia. *J Vasc Surg* 6: 152-157; 1987.
- 120.- Labbe R; Lindsay T; Gatley R; Romaschin A; Mickle D; Wilson G; Houle S; Walker P. Quantitation of postischemic skeletal muscle necrosis: histochemical and radioisotope techniques. *J Surg Res* 44: 45-53; 1988.
- 121.- Lapchinsky A.G. Recent results of experimental transplantation of preserved limbs and kidneys and possible use of this technique in clinical practice. *Annals of New York Academy of Sciences*. 87: 539-571; 1960.
- 122.- Larsson J; Hultman E. The effect of long-term arterial occlusion on energy metabolism of the human quadriceps muscle. *Scand J Clin Lab Invest* 39: 257-264; 1979.
- 123.- Lee Y.F; Gershuni D.H; Hargens A.R; Crenshaw A; Akeson W.H. Muscle necrosis and nerve function following tourniquet ischemia. *Trans Orthop Res Soc* 7: 366; 1982.
- 124.- Leonard A.G; Brennen M.D; Colville J. The use of continuous temperature monitoring in the postoperative management of microsurgical cases. *Br J Plast Surg* 35: 337; 1982.
- 125.- Leonard F. Tratado de cunicultura. 1: 57-59; 1980. Edit. Real Escuela Oficial y Superior de Avicultura. Barcelona.
- 126.- Lehr H.A; Guhlmann A; Nolte D; Keppler D; Messner K. Leukotrienes as mediators in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model in the hamster. *J Clin Invest* 87: 2036-2041; 1991.
- 127.- Lieber R.L; Pedowitz R.A; Hargens A.R; Gershuni D.H. Contractile properties of tibialis anterior after tourniquet application to the thigh. *Trans Orthop Res Soc* 15:263; 1990.
- 128.- Linder F; Vollmar J. Behandlung von Schlagaderverletzungen und ihre folgezustände. *Chirurg* 36: 55-63; 1965.
- 129.- Locker R.H; Wild D.J.C. "Ageing" of cold-shortened meat depends on the criterion. *Meat Sci* 10: 235-238; 1984.
- 130.- Lundborg G. Ischemic nerve injury. *Scand J Plast Reconstr Surg. Suppl* 6: 1-113; 1970.
- 131.- Lundborg G. Nerve injury and repair. Churchill Livingstone, New York. New York, 1989.
- 132.- Mäkitie J; Teravainen H. Ultrastructure of striated muscle of the rat after temporary ischemia. *Acta Neuropathol (Berl.)* 3: 237-245; 1977.
- 133.- Malt R.S; McKhann C.F. Replantation of severed arms. *J Am Med Ass* 189: 716-722; 1964.

- 134.- Matsen III F.A; Mayo K.A; Krugmire R.B. Jr; Sheridan G.W; Kraft G.H. A model compartmental syndrome in man with particular reference to the quantification of nerve function. *J Bone Joint Surg* Vol.59-A: 648-653; July 1977.
- 135.-Matsen III F.A. Compartment syndromes: Part A. Pathophysiology of compartment syndromes. *Instructio Course Lect* Vol.38: 463 (Chapter 43 Part A); 1989.
- 136.-May J.W; Lukash F.N; Gellico G.G. Removable thermocouple probe microvascular patency monitor. An experimental and clinical study. *Plast Reconstr Surg* 72: 366; 1983.
- 137.- McLaren A.C; Rorabeck C.H. The pressure distribution under tourniquets. *J Bone Joint Surg* 67-A: 434-438; March 1985.
- 138.- Messina L.M; Gardner A. In Vivo assessment of acute microvascular injury after reperfusion of ischemic tibialis anterior muscle of the hamster. *J Surg Res* 48: 615-621; 1990.
- 139.- Meyer R.A; Kushmerick M.J; Brown J.R. Application of P-31 NMR spectroscopy to the study of striated muscle metabolism. *Am J Physiol* 242: 11: 1-11; 1982.
- 140.- Meyer V.E. Wound closure and decompression in upper limb replantation. *Ann Hand Surg* 9: 129-134; 1990.
- 141.- Mickelson J.R. Calcium transport by bovine skeletal muscle mitochondria and its relationship to post-mortem muscle. *Meat Sci* 9: 205-229; 1983.
- 142.- Miller S.H; Price G; Buck D; Neeley J; Kennedy T.J; Graham W.P.III; Davis T.S. Effects of tourniquet ischemia and postischemic edema on muscle metabolism. *J Hand Surg* 4: 547-555; 1979.
- 143.- Mitrev Z; Beyersdorf F; Hallman R. Reperfusion injury in skeletal muscle: controlled limb reperfusion reduces local and systemic complications after prolonged ischaemia. *Cardiovasc Surg* 2: 737-748; 1994.
- 144.- Monserrat L; Bonito M. Motor axon reflex elicited by cutaneous stimulation. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 66: S70; 1987.
- 145.- Monzó E; Manzanos A; Cruz A; Franco M.L. Cuidados postoperatorios en las lesiones graves del miembro superior. *Rev Española Anest Rean* 35: 40-45; 1988.
- 146.- Moore W.S; Henry R.E; Malone J.M; Daly M.J; Patton D; Childers S.J. Prospective use of Xenon (Xe-133) clearance for amputation level section. *Arch Surg* 116: 86; 1981.
- 147.-Mubarak S.J; Hargens A.R; Owen C.A. The wick catheter technique for measurement of intramuscular pressure: A new research and clinical tool. *J Bone Joint Surg* 58-A: 1016-1020; 1976.
- 148.-Mubarak S.J; Owen C.A; Hargens A.R; Garetto L.P; Akeson W.H. Acute compartment syndromes. Diagnostic and treatment with the aid of the wick catheter. *J Bone Joint Surg* 60-A: 1091-1095; Dec.1978.
- 149.- Muramatsu I; Takahata N; Usui M; Ishii S. Metabolic and histologic changes in the ischemic muscles of replanted dog legs. *Clin Orthop Relat Res* 196: 292-299; June 1985.
- 150.- Newman R.J. Metabolic effects of tourniquet ischemia studied by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Bone Joint Surg Br* 66-B(4): 434-440; 1984.
- 151.- Nylander G; Lewis D; Nordström H; Larsson J. Reduction of postischemic edema with hyperbaric oxygen. *Plast Reconstr Surg* 76: 596-601; 1985.

- 152.- Ochoa J; Fowler T.J; Gilliat R.W. Anatomical changes in peripheral nerves compressed by a pneumatic tourniquet. *J Anat* 113: 433-455; 1972.
- 153.- Odeh M. The role of reperfusion-induced injury in the pathogenesis of the crush syndrome. *N Engl J Med* 324: 1417-1422; 1991.
- 154.- Onji Y; Murai Y; Tamai S; Hashimoto T; Yamaguchi T; Akiyama H; Tsujimoto A. Experimental surgery on resuscitation and reunion of amputated or nearly amputated leg. *Plast Reconstr Surg* 31: 151-165; 1963.
- 155.- Osterman A.L; Heppenstall R.B; Sapega A.A; Katz M; Chance B; Sokolow D. Muscle ischemia and hypothermia: A bioenergetic study using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Trauma* 24: 811-817; 1984.
- 156.- Panés J; Kurose I; Rodríguez-Vaca M.D; Anderson D.C; Miyasaka M; Tso P, et al. Diabetes exacerbates the inflammatory responses to ischemia-reperfusion. *Circulation* 93: 161-167; 1996.
- 157.- Panés J. El fenómeno de la isquemia reperusión. *Jano* Vol.53. Nº.1266: 63-65; Octubre 1997.
- 158.- Patterson S; Klenerman L. The effect of pneumatic tourniquets on the ultrastructure of skeletal muscle. *J Bone Joint Surg* 61-B(2): 178-183; 1979.
- 159.- Patterson S; Klenerman L; Biswas M; Rhodes A. The effect of pneumatic tourniquets on skeletal muscle physiology. *Acta Orthop Scand* 52: 171-175; 1981.
- 160.- Pedowitz R.A; Rydevik B.L; Gershuni D.H; Hargens A.R. An animal model for the study of neuromuscular injury induced beneath and distal to a pneumatic tourniquet. *J Orthop Res* 8: 899-908; 1990.
- 161.- Pedowitz R.A. Tourniquet-induced neuromuscular injury. *Acta Orthop Scand Suppl.* 245 (Vol.62): 1-33; 1991.
- 162.- Pedowitz R.A; Gershuni D.H; Schmidt A.H; Fridén J; Rydevik B.L; Hargens A.R. Muscle injury induced beneath and distal to a pneumatic tourniquet: a quantitative study of effects of tourniquet pressure and duration. *J Hand Surg (Am)* 16: 610-621; 1991.
- 163.- Pedowitz R.A; Fridén J; Thornell L.E. Skeletal muscle injury induced by a pneumatic tourniquet: an enzyme and immuno-histochemical study in rabbits. *J Surg Res* 52: 243-250; 1992.
- 164.- Petrasek PF; Homer-Vanniasinkam S; Walker P.M. Determinants of ischemic injury to skeletal muscle. *J Vasc Surg* 19(4): 623-631; Apr. 1994.
- 165.- Pintor J; Gualix J; Miras-Portugal M.T. Diinosine Polyphosphates, a group of dinucleotides with antagonistic effects on diadenosine polyphosphates receptor. *Molecular Pharmacology* 51: 277-284; 1997.
- 166.- Porter J.M; Baur G.M; Taylor L.M. Lower-extremity amputations for ischaemia. *Arch Surg* 116: 89; 1981.
- 167.- Presta M; Ragnotti G. Quantification of damage to striated muscle after normothermic or hypothermic ischemia. *Clin Chem* 27: 297-302; 1981.
- 168.- Radda G.K; Odoom J; Kemp G; Taylor D.J; Thompson C; Styles P. Assessment of mitochondrial function and control in normal and diseased states. *Biochim Biophys Acta* 1271 (1): 15-19; May 1995.

- 169.- Ratliff D.A; Clyne C.A.C; Chant A.D.B; Webster J.H.H. Prediction of amputation wound healing: the role of transcutaneous pO₂ assessment. *British J Surg* 71: 219; 1984.
- 170.- Rayan G.M. Acute compartment syndrome. *Contemp Orthop* 9: 54-63; May 1984.
- 171.- Reid H.S. Tourniquet hemostasis: A clinical study. *Orthop Trans* 6: 97-98; 1982.
- 172.- Reimer K.A; Jennings R.B; Tatum A.H. Pathobiology of acute myocardial ischemia: metabolic, functional and ultrastructural studies. *Am J Cardiol* 52: 72A-81A; 1983.
- 173.- Reneman R.S; Slaaf D.W; Lindbom L; Tangelder G.J; Arfors K.E. Muscle blood flow disturbances produced by simultaneously elevated venous and total muscle tissue pressure. *Microvasc Res* 20: 307-318; 1980.
- 174.- Richert F.L. The importance of circulatory balance in the survival of replanted limbs. *Bulletin of John Hopkins Hospital* 49: 315-324; 1931.
- 175.- Ripoll C; Martín F; Rovira J.M; Pintor J; Miras-Portugal M.T; Soria B. Diadenosine polyphosphates. A novel class of glucose-induced intracellular messengers in the pancreatic B-cell. *Diabetes* 45: 1431-1434; 1996.
- 176.- Rorabeck C.H; Clarke K.M. The pathophysiology of the anterior tibial compartment syndrome. An experimental investigation. *J Trauma* 18: 299-304; 1978.
- 177.- Rouviere H. Anatomía humana. Tomo III: 243-435; 1976. Edit. Bailly-Bailliere.
- 178.- Rubin B; Tittley J; Chang G. A clinically applicable method for long-term salvage of postischemic skeletal muscle. *J Vasc Surg* 13: 58-68; 1991.
- 179.- Rubin B.B; Liauw S; Tittley J; Romaschin A.D; Walker P.M. Prolonged adenine nucleotide resynthesis and reperfusion injury in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol* 262 H: 1538-1547; 1992.
- 180.- Santavirta S; Luoma A; Arstila A.U. Ultrastructural changes in striated muscle after experimental tourniquet ischemia and short reflow. *European Surg Res* 10: 415-419; 1978.
- 181.- Sapega A.A; Heppenstall R.B; Chance B; Park Y.S; Sokolow D.P. Tourniquet ischemia: A bioenergetic, biochemical and ultrastructural study. *Trans Orthop Res Soc* 8: 363-364; 1983.
- 182.- Sapega A.A; Osterman A.L; Katú M; Chance B; Heppenstall R.B. Hypothermic muscle ischemia: A bioenergetic study using P-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Trans Orthop Res Soc* 8: 251-252; 1983.
- 183.- Sapega A.A; Heppenstall R.B; Chance B; Park Y.S; Sokolow D. Optimizing tourniquet application and release times in extremity surgery. A biochemical and ultrastructural study. *J Bone Joint Surg* 67-A: 303-314; Feb.1985.
- 184.- Sapega A.A; Heppenstall R.B; Sokolow D.P; Graham T.J; Maris J.M; Ghosh A.K; Chance B; Osterman A.L. The bioenergetics of preservation of limbs before replantation. *J Bone Joint Surg Am* 70: 1500-1513; Dec. 1988.
- 185.- Schamagl E. Replantation of the extremities with special reference to flanking measures. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 18: 275-288; Sept.1986.
- 186.- Schuldiner S; Shirvan A; Linial M. Vesicular neurotransmitter transporters: from bacteria to humans. *Physiol Rev* 75: 369-392; 1995.

- 187.- Schwartz S.I. Principios de cirugía. 6ª Edic. Vol.I: 389-469; 1995. Edit. Interamericana·McGraw-Hill.
- 188.- Schwartz S.I. Principios de cirugía. 6ª Edic. Vol.II: 2023-2041; 1995. Edit. Intramericana·McGraw-Hill.
- 189.- Seo T; Matsuda M. A case of replantation of a completely amputated digit after 26 hours of warm ischemia. *J Reconstr Microsurg* 3: 143-146; Jan. 1987.
- 190.- Sexton W.L; Korthuis R.J; Laughlin M.H. Ischemia-reperfusion in isolated rat hindquarters. *J Appl Physiol* 68: 387-392; 1990.
- 191.- Shanghai sixth peoples hospital, Shanghai. Extremity replantation. *Chin Med J* 1: 5-10; 1978.
- 192.- Shenton D.W; Spitzer S.A; Mulrennan B.N. Tourniquet-induced rhabdomyolysis. A case report. *J Bone Joint Surg (Am)* 72: 1405-1406; 1990
- 193.- Sheridan G.W; Matsen III F.A; Krugmire R.B. Jr. Further investigations on the pathophysiology of the compartment syndrome. *Clin Orthop* 123: 266-270; 1977.
- 194.- Shim S.S; Copp D.H; Patterson F.P. Measurement of the rate and distribution of the nutrient and other arterial blood supply in long bones of the rabbit. A study of the relative contribution of the three arterial systems. *J Bone Joint Surg* 50 B: 178-183; 1968.
- 195.- Sierra A. Manual de cirugía de urgencias. Sección II: 145-161; 1997. Edit. Arké 144, S.L.
- 196.-Silverman D.G; Cedrone F.A; Hurford W.E; Bering T.G; LaRossa D.D. Monitoring tissue elimination of fluorescein with the perfusion fluorometer: A new method to assess capillary blood flow. *Surgery* 90: 409-417; 1981.
- 197.- Skjeldal S; Groggaard B; Reikeras O; Müller C; Torvik A; Svindland A. Model for skeletal muscle ischemia in rat hindlimb. Evaluation of reperfusion and necrosis. *Eur Surg Res* 23: 355-365; 1991.
- 198.- Skjeldal S; Groggaard B; Nordsletten L; Reikeras O; Svindland A; Torvik A. Protective effect of low-grade hypothermia in experimental skeletal muscle ischemia. *Eur Surg Res* 24: 197-203; 1992.
- 199.- Smith A.R; Van Alphen W.A; Van der Pompe W.B. Lymphatic drainage in patients after replantation of extremities. *Plast Reconstr Surg* Vol.79: 163; Febr. 1987.
- 200.- Smith D.J; Bendick P.J; Madison S.A. Evaluation of vascular compromise in the injured extremity: A photoplethysmographic technique. *J Hand Surg* 9-A: 314; 1984.
- 201.- Snyder C.C; Knowles R.P; Mayer P.W; Hobbs J.C. Extremity replantation. *Plast Reconstr Surg* Vol.26: 251-263; 1960.
- 202.- Song Y.G; Chen G.Z; Song Y.L. The free thigh flap: A new free flap concept based on the septocutaneous arteries. *Br J Plast Surg* 37: 149; 1984.
- 203.- Soussi B; Idstrom J.P; Bylund-Fellenius A.C; Schersten T. Dynamics of skeletal muscle energetics during ischemia and reperfusion assessed by in vivo ³¹-P NMR. *Nucl Magn Reson Biomed* 3: 71-77; 1990.
- 204.- Spence V.A; Walker W.F; Troup I.M; Murdoch G. Amputation of the ischaemic limb: selection of the optimum site by thermography. *Angiology* 32: 155; 1981.

- 205.- Stein J.H. Medicina interna. 3ª Edic. Tomo 2. Principios de terapia antiinfecciosa: 1195-1211; 1991. Edit. Salvat.
- 206.- Sternbergh W.C. 3º; Adelman B. Post-ischemic skeletal muscle injury: influence of fiber type, regional flow, and compartmental location (Abstract). J Cardiovasc Surg 32 (4 suppl): 9-10; 1991.
- 207.- Sternbergh W.C. 3º; Adelman B. The temporal relationship between endothelial cell dysfunction and skeletal muscle damage after ischemia and reperfusion. J Vasc Surg 16: 30-39; 1992.
- 208.- Stolz J.F. Hemorhéologie et hemodilution. Ann Fr Anesth Rean 5: 193-203; 1986.
- 209.- Strock P.E; Majno G. Microvascular changes in acutely ischemic rat muscle. Surg Gynec Obstet 129: 1213-1224; 1969.
- 210.- Sugino K; Yamada K; Kawasaki T. Analysis of adenine nucleotides by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 361: 427; 1986.
- 211.- Swanson A.B; Livengood L.C; Sattel A.B. Local hypothermia to prolong safe tourniquet time. Clin Orthop 264: 200-208; 1991.
- 212.- Swartz W.M; Cha C.J.M; Clowes G.H.A. Jr; Randall H.T. The effect of prolonged ischemia on high energy phosphate metabolism in skeletal muscle. Surg Gynecol Obstet 147: 872-876; Dec. 1978.
- 213.- Takami H; Takahashi S; Ando M. Microvascular free musculocutaneous flaps for the treatment of avulsion injuries of the lower leg. J Trauma 23: 473; 1983.
- 214.- Taylor D.J; Bore P.J; Styles P. Bioenergetics of intact human muscle: A 31-P nuclear magnetic resonance study. Mol Biol Med 1: 77; 1983.
- 215.- Tof-Guard INMT. Manual de instrucciones: 91-118; 1997. Edit. Organón Técnica.
- 216.- Toft PB; Fugleholm K; Scmalbruch H. Axonal branching following crush lesions of peripheral nerves of rat. Muscle Nerve 11: 880-889; 1988.
- 217.- Trueta J; Cavadias A. Study of the blood supply of the long bones. Surg Gynec Obstet 118: 485; 1964.
- 218.- Tsai T.M; Jupiter J.B; Serretoni F; Seki T; Okubo K. The effect of hypothermia and tissue perfusion on extended myocutaneous flap viability. Plast Reconstr Surg 70: 444-454; 1982.
- 219.- Usui M; Ishii S; Muramatsu I; Takahata N. An experimental study on "replantation toxemia". The effect of hypothermia on an amputated limb. J Hand Surg Vol.3: 589-596; 1978.
- 220.- Van Alphen W.A; Smith A.R; Kate F.J. Maximum hypothermic ischemia in replants containing muscular tissue. J Hand Surg 13 A: 415; 1988.
- 221.- VanGiensen P.J; Seaber A.V; Urbaniak J.R. Storage of amputated parts prior to replantation. An experimental study with rabbit ears. J Hand Surg 8: 60-65; 1983.
- 222.- Vaquero C. Manual de experimentación animal. Experimentación animal en Medicina. 1: 1-92; 1993. Edit. Universidad de Valladolid.
- 223.- Vaquero C. Manual de experimentación animal. Experimentación animal en Medicina. 1: 153-161; 1993. Edit. Universidad de Valladolid.

- 224.- Vaquero C. Manual de experimentación animal. Experimentación animal en Medicina. 1: 177-193; 1993. Edit. Universidad de Valladolid.
- 225.-Vaquero F. Isquemias agudas. Centro de Documentación Uriach. Barcelona. 1994.
- 226.-Velázquez. Farmacología. 16ª Edic. Bloqueantes neuromusculares: 255-265; 1993. Edit. Interamericana-McGraw-Hill.
- 227.-Velázquez. Farmacología. 16ª Edic. Benzodiacepinas: 317-341; 1993. Edit. Interaamericana-McGraw-Hill.
- 228.-Velázquez. Farmacología. 16ª Edic. Anestésicos generales. Hipnóticos: 395-415; 1993. Edit. Interamericana-McGraw-Hill.
- 229.-Viver E; Ros E. Patología vascular. Edika med. Barcelona. 1993.
- 230.- Volkmann R (Transl.Bick, E.M). Ischaemic muscle paralyses and contractures. Clin Orthop Rel Res 50: 5-6; 1967.
- 231.- Williams I.R; Jefferson D; Gilliatt R.W. Acute nerve compression during limb ischemia. J Neurol Sci 46: 199-207; 1980.
- 232.- Wolff K-D; Stiller D. Ischemia tolerance of free-muscle flaps: An NMR-Spectroscopic study in the rat. Plast Reconstr Surg Vol.91, Nº. 3: 485-491; 1993.
- 233.- Wright J.G; Araki C.T; Belkin M; Hobson R.W. Postischemic hypothermia diminishes skeletal muscle reperfusion edema. J Surg Res 47: 389-396; 1989.
- 234.- Wyss C.R; Harrington R.M; Burgess E.M; Matsen F.A. Transcutaneous oxygen tension as a predictor of success after an amputation. J Bone Joint Surg Vol. 70-A: 203; Nov 1988.
- 235.- Zimmerman B.J; Granger D.N. Mechanisms of reperfusion injury. Am J Med Sci 307: 284-292; 1994.